



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 1 月 2 7 日
Date of Application:

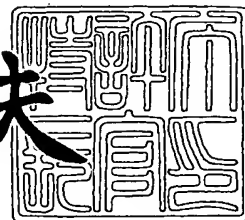
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 4 3 8 0 7
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 3 4 3 8 0 7]

出 願 人
Applicant(s): 理化学研究所
 オリンパス光学工業株式会社

2 0 0 3 年 9 月 3 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 8 0 2 6 8

(Translation)

**PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT**

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: November 27, 2002

Application Number: Patent Application No. 2002-343807

Applicant(s): THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH
OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.

September 30, 2003

Commissioner,

Japan Patent Office Yasuo IMAI (seal)

Certificate No. 2003-3080268

[Name of Document] Patent Application

[Reference Number] 02P01768

[Filing Date] November 27, 2002

[Addressee] Commissioner, Patent Office

[Int.Pat. Classification] G02B 21/18

[Inventor]

 [Domicile or Dwelling] c/o THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL
RESEARCH, 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama

 [Name] Atsushi MIYAWAKI

[Inventor]

 [Domicile or Dwelling] c/o THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL
RESEARCH, 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama

 [Name] Takashi FUKANO

[Inventor]

 [Domicile or Dwelling] c/o OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.
43-2, Hatagaya 2-chome, Shibuya-ku, Tokyo

 [Name] Yasushi AONO

[Patent Applicant]

 [Identification Number] 000006792

 [Name] THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL
RESEARCH

[Patent Applicant]

 [Identification Number] 000000376

 [Name] OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.

 [Representative] Tsuyoshi KIKUKAWA

[Agent]

 [Identification Number] 100065824

 [Name] Taiji SHINOHARA

[Nominated Agent]

 [Identification Number] 100104983

 [Name] Masayuki FUJINAKA

[Indication of Fee]

[Prepayment Register Number] 017938

[Prepaid Sum] ¥21,000

[List of Submitted Articles]

[Name of Article] Specification 1

[Name of Article] Drawings 1

[Name of Article] Abstract 1

[Number of General Power of Attorney] 0116478

[Whether or not a Proof is Necessary] Necessary

【書類名】 特許願

【整理番号】 02P01768

【提出日】 平成14年11月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G02B 21/18

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

 【氏名】 宮脇 敦史

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

 【氏名】 深野 天

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリnpas 光学工業株式会社内

 【氏名】 青野 寧

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

 【識別番号】 000000376

 【氏名又は名称】 オリnpas 光学工業株式会社

 【代表者】 菊川 剛

【代理人】

 【識別番号】 100065824

 【氏名又は名称】 篠原 泰司

【選任した代理人】

 【識別番号】 100104983

 【氏名又は名称】 藤中 雅之

【手数料の表示】**【予納台帳番号】** 017938**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【包括委任状番号】** 0116478**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 白色光源と、

前記光源から出射された光束を複数の照射光の光束に分岐する光束分割手段と

、
前記光束分割手段により分岐された夫々の照明光の光路上に夫々設けられた、
各照明光の波長を選択する波長選択手段と、

波長が選択された前記複数の照射光の光束を単一の光束に合成する光束合成手段と、

を備えることを特徴とする顕微鏡の照明装置。

【請求項 2】 白色光源と、

前記光源から出射された光束を第 1 の照射光の光束と第 2 の照射光の光束とに分岐する光束分割手段と、

前記第 1 の照射光の波長を選択する第 1 の波長選択手段と、

前記第 2 の照射光の波長を選択する第 2 の波長選択手段と、

波長が選択された前記第 1 の照射光の光束と波長が選択された前記第 2 の照射光の光束とを単一の光束に合成する光束合成手段と、

を備えることを特徴とする顕微鏡の照明装置。

【請求項 3】 白色光源と、

前記光源から出射された光束を複数の照射光の光束に分岐する光束分割手段と

、
前記光束分割手段により分岐された夫々の照明光の光路上に夫々設けられた、
各照明光の波長を選択する波長選択手段と、

波長が選択された前記複数の照射光の光束を単一の光束に合成する光束合成手段と、

前記光束合成手段で合成された光束を試料に照射する方向に導くとともに、試料からの光を透過するミラーと、

前記ミラーと試料との間に配置された対物レンズと、

前記対物レンズ及び前記ミラーを通過した前記試料からの蛍光を夫々の波長で励起された蛍光に分離して撮像する撮像素子と、

前記撮像素子で撮像された蛍光像を処理する画像処理手段と、
を備えることを特徴とする顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【請求項 4】 白色光源と、

前記光源から出射された光束を第 1 の照射光の光束と第 2 の照射光の光束とに分岐する光束分割手段と、

前記第 1 の照射光の波長を選択する第 1 の波長選択手段と、

前記第 2 の照射光の波長を選択する第 2 の波長選択手段と、

波長が選択された前記第 1 の照射光の光束と波長が選択された前記第 2 の照射光の光束とを単一の光束に合成する光束合成手段と、

前記光束合成手段で合成された光束を試料に照射する方向に導くとともに、試料からの光を透過するミラーと、

前記ミラーと試料との間に配置された対物レンズと、

前記対物レンズ及び前記ミラーを通過した前記試料からの蛍光を第 1 の波長で励起された蛍光と第 2 の波長で励起された蛍光とに分離して撮像する撮像素子と、

前記撮像素子で撮像した蛍光像を処理する画像処理手段と、
を備えることを特徴とする顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【請求項 5】 白色光源と、

前記光源から出射された光束を複数の照射光の光束に分岐する光束分割手段と、

前記光束分割手段により分岐された夫々の照明光の光路上に夫々設けられた、各照明光の波長を選択する波長選択手段と、

波長が選択された前記複数の照射光の光束を単一の光束に合成する光束合成手段と、

前記光束合成手段で合成された光束を試料に照射する方向に導く第 1 の対物レ

ンズと、

前記試料を挟んで前記第 1 の対物レンズに対向して配置された第 2 の対物レンズと、

前記第 2 の対物レンズを通過した前記試料からの蛍光を夫々の波長で励起された蛍光に分離して撮像する撮像素子と、

前記撮像素子で撮像された蛍光像を処理する画像処理手段と、
を備えることを特徴とする顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【請求項 6】 白色光源と、

前記光源から出射された光束を第 1 の照射光の光束と第 2 の照射光の光束とに分岐する光束分割手段と、

前記第 1 の照射光の波長を選択する第 1 の波長選択手段と、

前記第 2 の照射光の波長を選択する第 2 の波長選択手段と、

波長が選択された前記第 1 の照射光の光束と波長が選択された前記第 2 の照射光の光束とを単一の光束に合成する光束合成手段と、

前記光束合成手段で合成された光束を試料に照射する方向に導く第 1 の対物レンズと、

前記試料を挟んで前記第 1 の対物レンズに対向して配置された第 2 の対物レンズと、

前記第 2 の対物レンズを通過した前記試料からの蛍光を第 1 の波長で励起された蛍光と第 2 の波長で励起された蛍光とに分離して撮像する撮像素子と、

前記撮像素子で撮像された蛍光像を処理する画像処理手段と、
を備えることを特徴とする顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、複数の光の波長を自由に選択でき、かつ、その光強度を独立して調整でき、それらの光を同時に試料に照射しうる顕微鏡の照明装置及びその照明装

置を用いた画像処理装置に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

一般に、蛍光顕微鏡は、医学や生物学をはじめ、その他の分野において生物組織や細胞の蛍光標識を施したタンパク質や遺伝子等を検出する目的で広く用いられている。特に近年では、複数の蛍光色素で染色した標本や複数の蛍光タンパク質を発現させた標本を時間的に一度に観察する多重蛍光検出が、遺伝子の解析や、細胞内構造の解明に威力を発揮している。多重蛍光検出では、多重蛍光標本を励起するために複数波長による照明光を標本に照射する手段が広く用いられているが、これに際しては、各々の波長を照射する時間的間隔が短いこと、また、標本面上での波長毎の照射光強度分布が時間的かつ空間的に変化しないことが、観察データの正確性を左右する重要な要素となる。

【0 0 0 3】

従来、多重蛍光標本を励起するための複数波長による照明光を標本に照射する手段としては、フィルタ切換手段を用いて励起光の波長を時分割するようにした装置（例えば、特許文献 1 参照）や、2 つの独立した光源を用いた装置（例えば、特許文献 2 参照）が提案されている。また、従来、単一の光源からの光を分割して標本に照射するようにした装置（例えば、特許文献 3）が提案されている。

【0 0 0 4】

【特許文献 1】

特開平 0 9 - 0 0 5 2 4 3 号公報

【特許文献 2】

特開平 0 7 - 0 5 6 0 9 2 号公報

【特許文献 3】

特開平 1 0 - 0 9 0 6 0 8 号公報

【0 0 0 5】

特許文献 1 に記載の装置は、図 1 1 に示すように、測定対象の生体組織を複数の蛍光処理で予め処理し、複数の励起光選択用フィルタ 1 5 1 a を 1 つの回転円板 1 5 1 b 内の所定箇所に設置したフィルタ切換手段 1 5 1 と、複数の蛍光選択

用フィルタ 152 a を回転円板 152 b 内の他の箇所に設置したフィルタ切換手段 152 とを用い、それらを同期して回転させることにより、第 1 の励起光と第 2 の励起光を時分割で該生体組織に照射するとともに、該生体組織から生ずる第 1 の蛍光と第 2 の蛍光を順次記録し、例えば、細胞内イオン濃度の変化と膜電位変化夫々を実質的に同時に測定するように構成されている。

【0006】

また、特許文献 2 に記載の装置は、図 12 に示すように、キセノンランプ等の白色光源 161 A, 161 B を 2 つ用い、夫々のランプからの光をコレクタレンズ 162 A, 162 B を介して集光した後、透過波長域の異なる励起フィルタ 163 A, 163 B を透過させて波長の選択を行い、選択された波長の光をダイクロミックミラー 164 で合成して、観察光学系 165 に導入するように構成されている。特許文献 2 に記載の装置によれば、励起フィルタ 163 A, 163 B を適宜交換することにより、所望の波長で照明することができる。

【0007】

また、特許文献 3 に記載の装置は、図 13 に示すように、照射用光源 171 から出射される照射光を分岐光学系 172 を介して分割し、各々の光 A, B を試料 173 上の異なる部位に照射するように構成されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、特許文献 1 に記載の装置では、第 1 の励起光を選択するフィルタと第 2 の励起光を選択するフィルタまたは第 1 の蛍光を選択するフィルタと第 2 の蛍光を選択するフィルタを回転によって切り替えるためのわずかな時間のロスが生じ、この時間のロスは線虫のような動きの速い試料や心筋内のカルシウムイオン濃度の伝播等のような変化の速い現象を測定するには不適である。

また、このような回転円板を駆動するための手段としては、一般にモーター等が用いられるが、モーターによって発生する振動の影響で焦点がずれてしまう等の問題が生ずる。したがって、回転円板を駆動する際に生じる振動を低減するために顕微鏡一式を空気ばね等で構成される防振台の上に載せる等の措置が必要となる。

【0009】

回転円板等の機械的駆動部を有しない手法としては、複数の特定の波長において透過率がピークを持つような干渉フィルタ（励起フィルタ）を用い、これにより試料に複数の波長の光を完全の同時に照射する手法が考えられる。この手法によれば、機械的駆動部を有しないため振動の発生等の問題も生じない。しかし、このような特性を持つように作製された励起フィルタは、製作後にその透過特性を改変することが困難である。したがって、例えば、2色の異なる色素で染色された試料を測定する場合、一方の色素に対応する蛍光が強く、他方の色素に対応する蛍光が弱い場合には、夫々の色素に対応する波長の励起光の強度の調整ができないといった問題がある。

【0010】

また、特許文献1に記載の装置では、励起光を試料157に導くダイクロイックミラー158には、2つあるいは3つの特定の波長にのみ高い反射特性をもつダイクロイックミラーが用いられる。一般に、まず、このダイクロイックミラーを作成し、次いでダイクロイックミラーの反射特性に合わせて励起フィルタが設計・製作されるが、このダイクロイックミラーの反射ピーク波長と励起フィルタの透過ピーク波長とを完全に合致させることは難しく、結果として非常にコストが高価なものになってしまうという問題もある。

【0011】

また、特許文献2に記載の装置では、光源の強度は2つの光源ごとにランダムに変動するため、夫々の光源からの光で励起された蛍光像のレシオを計算した場合、この変動によってレシオ値が不確かなものになってしまうという問題がある。

【0012】

また、特許文献3に記載の装置は、単一波長の光源からの光を分割して試料上の異なる複数の部位に照射することを目的として構成されたものであり、分割した光を再び同一の光束として合成する手段や波長を分離する手段を具備していないため、標本に複数の波長の光を同一の照射強度分布で照射することができない。

【0013】

本発明は、上記問題点を解決するためになされたものであり、標本に複数の波長の光を同時にかつ同一の照射強度分布で照射することができ、夫々の光の波長や強度を独立して設定することができる顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置を提供することを目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成するため、本第1の発明による顕微鏡の照明装置は、白色光源と、前記光源から出射された光束を複数の照射光の光束に分岐する光束分割手段と、前記光束分割手段により分岐された夫々の照明光の光路上に夫々設けられた、各照明光の波長を選択する波長選択手段と、波長が選択された前記複数の照射光の光束を単一の光束に合成する光束合成手段と、を備えることを特徴としている。

【0015】

また、本第2の発明による顕微鏡の照明装置は、白色光源と、前記光源から出射された光束を第1の照射光の光束と第2の照射光の光束とに分岐する光束分割手段と、前記第1の照射光の波長を選択する第1の波長選択手段と、前記第2の照射光の波長を選択する第2の波長選択手段と、波長が選択された前記第1の照射光の光束と波長が選択された前記第2の照射光の光束とを単一の光束に合成する光束合成手段と、を備えることを特徴としている。

【0016】

また、本第3の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、白色光源と、前記光源から出射された光束を複数の照射光の光束に分岐する光束分割手段と、前記光束分割手段により分岐された夫々の照明光の光路上に夫々設けられた、各照明光の波長を選択する波長選択手段と、波長が選択された前記複数の照射光の光束を単一の光束に合成する光束合成手段と、前記光束合成手段で合成された光束を試料に照射する方向に導くとともに、試料からの光を透過するミラーと、前記ミラーと試料との間に配置された対物レンズと、前記対物レンズ及び前記ミラーを通過した前記試料からの蛍光を夫々の波長で励起さ

れた蛍光に分離して撮像する撮像素子と、前記撮像素子で撮像された蛍光像を処理する画像処理手段と、を備えることを特徴としている。

【0017】

また、本第4の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、白色光源と、前記光源から出射された光束を第1の照射光の光束と第2の照射光の光束とに分岐する光束分割手段と、前記第1の照射光の波長を選択する第1の波長選択手段と、前記第2の照射光の波長を選択する第2の波長選択手段と、波長が選択された前記第1の照射光の光束と波長が選択された前記第2の照射光の光束とを単一の光束に合成する光束合成手段と、前記光束合成手段で合成された光束を試料に照射する方向に導くとともに、試料からの光を透過するミラーと、前記ミラーと試料との間に配置された対物レンズと、前記対物レンズ及び前記ミラーを通過した前記試料からの蛍光を第1の波長で励起された蛍光と第2の波長で励起された蛍光とに分離して撮像する撮像素子と、前記撮像素子で撮像された蛍光像を処理する画像処理手段と、を備えることを特徴としている。

【0018】

また、本第5の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、白色光源と、前記光源から出射された光束を複数の照射光の光束に分岐する光束分割手段と、前記光束分割手段により分岐された夫々の照明光の光路上に夫々設けられた、各照明光の波長を選択する波長選択手段と、波長が選択された前記複数の照射光の光束を単一の光束に合成する光束合成手段と、前記光束合成手段で合成された光束を試料に照射する方向に導く第1の対物レンズと、前記試料を挟んで前記第1の対物レンズに対向して配置された第2の対物レンズと、前記第2の対物レンズを通過した前記試料からの蛍光を夫々の波長で励起された蛍光に分離して撮像する撮像素子と、前記撮像素子で撮像された蛍光像を処理する画像処理手段と、を備えることを特徴としている。

【0019】

また、本第6の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、白色光源と、前記光源から出射された光束を第1の照射光の光束と第2の照射光の光束とに分岐する光束分割手段と、前記第1の照射光の波長を選択

する第1の波長選択手段と、前記第2の照射光の波長を選択する第2の波長選択手段と、波長が選択された前記第1の照射光の光束と波長が選択された前記第2の照射光の光束とを単一の光束に合成する光束合成手段と、前記光束合成手段で合成された光束を試料に照射する方向に導く第1の対物レンズと、前記試料を挟んで前記第1の対物レンズに対向して配置された第2の対物レンズと、前記第2の対物レンズを通過した前記試料からの蛍光を第1の波長で励起された蛍光と第2の波長で励起された蛍光とに分離して撮像する撮像素子と、前記撮像素子で撮像された蛍光像を処理する画像処理手段と、を備えることを特徴としている。

【0020】

【発明の実施の形態】

実施例の説明に先立ち、本発明の作用効果について説明する。

本第1又は第2の発明のように構成すると、1個の光源のみで、異なる複数又は2つの波長域の光で試料を照明することができるので、複数の光源を用いた場合のように、各光源の空間的な強度分布の違いの影響を受けることなく均一な照明が可能となる。

また、1個の光源のみで、異なる複数又は2つの波長域の光で試料を励起することができるので、複数の光源を用いた場合のように、各光源の時間的な変動の違いが生じない。

また、異なる複数又は2つの波長の光を時間的に完全に同時に試料を照明することができる。

【0021】

また、本第3又は第4の発明のように構成すると、1個の光源のみで、異なる複数又は2つの波長域の光で試料を照明することができるので、複数の光源を用いた場合のように、各光源の空間的な強度分布の違いの影響を受けることなく均一な照明が可能となる。

また、1個の光源のみで、異なる複数又は2つの波長域光で試料を励起することができるので、複数の光源を用いた場合のように、各光源の時間的な変動の違いの影響を受けることなく、レシオ画像を確実に得ることができる。

また、異なる複数又は2つの波長の光で時間的に完全に同時に励起した蛍光像

を取得できるので、変化の速い現象や、動きの速い試料を観察することができる。

また、ミラーの反射ピーク波長に合わせて最適な励起フィルタを選ぶことができるので、高価なデュアルピークの励起フィルタなど、ピーク波長が複数となる特性を有する励起フィルタを用いる必要がなく、結果としてコストを低減させることができる。

【0022】

本第5又は第6の発明のように構成すると、励起光と蛍光が別の光路をとるため、ダイクロイックミラーや半透鏡を入れて励起光と蛍光を分離する必要がなくなる。このため、励起光及び蛍光を効率良く伝送することができ、特に暗い蛍光試料を観察する場合に有効となる。

また、高価なデュアルダイクロイックミラーを用いる必要がないため、コストを低減させることができる。

【0023】

更に、本第1～6の発明は、次のように構成すると好ましい。

本第7の発明として、本第3又は第5の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記複数の照射光のうちの少なくともいずれかの照明光の強度を調整する光量調整手段を更に備えるのが好ましい。

また、本第8の発明として、本第4又は第6の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記第1の照射光の強度を調整する第1の光量調整手段と前記第2の照射光の強度を調整する第2の光量調整手段の双方またはいずれか一方を更に備えるのが好ましい。

【0024】

本第7又は第8の発明のように構成すると、複数又は2つの励起光強度のバランスを自由に変えることができ、一方の励起光に対応する蛍光の強度が、他方の励起光に対応する蛍光の強度よりも極端に強い場合でも、励起光強度のバランスを調整して、双方の励起光に対応する蛍光強度を同等にすることにより、カメラのダイナミックレンジを有効に活用することができる。

また、減光フィルタを時間的に切り替える必要がなく、不要な振動の発生を抑

え、振動にともなう焦点位置がずれることもない。

【0025】

また、本第9の発明として、本第3又は第5の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記複数の照射光のうちの少なくともいずれかの照明光の偏光方向を選択する偏光方向選択手段を更に備えるのが好ましい。

また、本第10の発明として、本第4又は第6の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記第1の照射光の偏光方向を選択する第1の偏光方向選択手段と前記第2の照射光の偏光方向を選択する第2の偏光方向選択手段の双方またはいずれか一方を更に備えるのが好ましい。

【0026】

本第9又は第10の発明のように構成すると、励起スペクトルが双峰型でかつ、その励起スペクトルの形が、例えばカルシウムイオンの濃度に依存して変化するような蛍光物質を用いる場合、偏光方向が互いに直行する2つの波長の励起光で同時に試料を励起して蛍光を発生させる。その蛍光のうち、夫々の励起光の偏光方向と同一の偏光方向を有する成分を分離して画像化し、さらには、得られた2つの画像の比を計算してレシオ画像を測定することにより、例えば、カルシウムイオンの濃度の変化を時間のずれをまったく生じさせずに完全に同一の時間で測定することができ、変化が早い現象や動きの速い試料でも測定することが可能となる。

【0027】

また、本第11の発明として、本第3又は第5の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記複数の照射光のうちの少なくともいずれかの照明光の波長分布を監視する波長分布監視手段を更に備えるのが好ましい。

また、本第12の発明として、本第4又は第6の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記第1及び前記第2の照射光の双方または一方の波長分布を監視する波長分布監視手段を更に備えるのが好ましい。

【0028】

本第11又は第12の発明のように構成すると、試料に入射する光の波長分布を確実に監視することができる。

【0029】

また、本第13の発明として、本第3又は第4の発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記ミラーが半透鏡であるのが好ましい。

【0030】

本第13の発明のように構成すると、反射率及び透過率に波長依存性がほとんどない半透鏡を用いることで、ミラーの反射特性に制約されずに、用いる蛍光物質に合わせて励起フィルタ及び蛍光フィルタを最適に選択することができる。また、高価なデュアルダイクロイックミラーを用いる必要がないため、コストを低減させることができる。

【0031】

また、本第14の発明として、本第3～第6のいずれかの発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記光束分割手段及び前記光束合成手段がダイクロイックミラーであるのが好ましい。

【0032】

本第14の発明のように構成すると、光束分割手段及び光束合成手段として半透鏡を用いた場合と比べて励起光のロスを最小限に抑え、試料を励起することができるので、特に暗い試料を観察する場合に有効である。

【0033】

また、本第15の発明として、本第3～第6のいずれかの発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記光束分割手段及び前記光束合成手段が偏光ビームスプリッタであるのが好ましい。

【0034】

本第15の発明のように、光束分割手段及び光束合成手段として偏光ビームスプリッタを用いると、光学系を簡素化することができ、かつ、本第9又は第10の発明と同等の効果を得ることができる。また、半透鏡を用いるのに比べて光源

から出射した光のロスが少なく、効率良く試料に光を照明することができる。

【0035】

なお、本第16の発明として、本第3、第5、第7、第9、第11のいずれかの発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記複数の波長選択手段のうちの少なくともいずれかが、前記光路分岐手段により分岐された光路上に挿脱可能に配置されるのが好ましい。

また、本第17の発明として、本第4、第6、第8、第10、第12のいずれかの発明による顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、前記第1の波長選択手段と前記第2の波長選択手段の少なくともいずれかが、前記光路分岐手段により分岐された光路上に挿脱可能に配置されるのが好ましい。

【0036】

【実施例】

以下、本発明の実施例を図面を用いて説明する。

第1実施例

図1は本発明の第1実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。

本実施例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、アークやフィラメントやLED等により点灯される白色光源11と、光源11から出射された光束を第1の照射光の光束と第2の照射光の光束とに分岐する光束分割手段である半透鏡21と、第1の照射光の波長を選択する第1の波長選択手段である励起フィルタ24Aと、第2の照射光の波長を選択する第2の波長選択手段である励起フィルタ24Bと、波長が選択された第1の照射光の光束と波長が選択された第2の照射光の光束とを単一の光束に合成する光束合成手段である半透過鏡25と、半透過鏡25で合成された光束を試料43に照射する方向に導くとともに、試料43からの光を透過するミラーであるダイクロイックミラー41と、ダイクロイックミラー41と試料43との間に配置された対物レンズ42と、対物レンズ42及びダイクロイックミラー41を通過した試料43からの蛍光を夫々の波長で励起された蛍光に分離して撮像する撮像素子であるカメラ53A、53Bと、カメラ53A、53Bで撮像された蛍光像を処理する画像処理手

段である画像処理部 61 を有して構成されている。

【0037】

光源 11 は、紫外波長域から可視波長域の光を発する水銀ランプやキセノンランプを用いた光源で構成されている。光源 11 から発せられた光は、コレクタレンズ 12 に入射するようになっている。コレクタレンズ 12 は、光源 11 からの光を平行光束に変換するように構成されている。コレクタレンズ 12 を介して平行光束に変換された光は、光束分割手段である半透鏡 21 に入射するようになっている。

【0038】

半透鏡 21 は、入射光束の一部を反射させ、残りを透過させる機能を有している。

半透鏡 21 を透過した光束 A の光路上には、反射鏡 22 A と、減光フィルタ 23 A と、励起フィルタ 24 A が配置されている。また、半透鏡 21 で反射した光束 B の光路上には、反射鏡 22 B と、減光フィルタ 23 B と、励起フィルタ 24 B が配置されている。

【0039】

反射鏡 22 A 及び反射鏡 22 B には、光束 A 及び光束 B が半透鏡 25 を経た後の進行方向及び光路上の位置を完全に一致させるための傾き調整機構（不図示）が備えられている。

減光フィルタ 23 A 及び 23 B は、夫々光束 A の光量及び光束 B の光量を個別に独立して調整することができるようになっている。

また、減光フィルタ 23 A 及び 23 B は、夫々ターレット又はスライダーを介して光束 A 及び光束 B の光路に容易に挿脱可能に設けられている。

励起フィルタ 24 A 及び 24 B は、夫々光束 A 及び光束 B における特定の波長域の光のみを透過させる性質を有しており、夫々ターレット又はスライダーを介して光束 A 及び光束 B の光路に容易に挿脱可能に設けられている。

【0040】

半透鏡 25 は、光束 A の一部を透過させ、光束 B の一部を反射させる特性を有している。半透鏡 25 を経た後の光束 A と光束 B は、上述の傾き調整機構を介し

て反射鏡 22A 及び反射鏡 22B の傾き調整が施されることにより進行方向及び光路上の位置が完全に一致している。

【0041】

図中、31 は半透鏡 25 で合成された光束 A 及び光束 B の光源像を対物レンズ 42 の瞳面に導く投影レンズ、44 はダイクロイックミラー 41 を透過した試料 43 からの蛍光を反射鏡 45 で反射させてカメラ 53A 及び 53B の撮像面上に結像させる結像レンズである。

ダイクロイックミラー 41 は、その反射ピーク波長が 2 つある反射特性を有するデュアルダイクロイックミラーを用いて構成されており、投影レンズ 31 を透過した光を対物レンズ 42 側に反射すると共に、試料 43 から発した蛍光を透過するようになっている。

【0042】

また、図中、51 は試料 43 からの蛍光をその波長によって透過あるいは反射させるダイクロイックミラー、52A 及び 52B はダイクロイックミラー 51 を介して分割された光束 A' 及び光束 B' の光において、夫々特定の波長域のみを透過させる蛍光フィルタである。

蛍光フィルタ 52A 及び 52B は、夫々ターレット又はスライダーを介して光束 A' 及び光束 B' の光路に容易に挿脱可能に設けられている。

カメラ 53A 及び 53B は、蛍光フィルタ 52A 及び 52B を透過した光束 A' 及び光束 B' を撮像するように設けられている。

【0043】

画像処理部 61 は、カメラ 53A 及びカメラ 53B から出力される電気信号をメモリーに蓄積し、さらに、得られた試料 43 の蛍光画像の種々の演算を行うように構成されている。

図中、62 は画像表示部である。画像表示部 62 は、画像処理部 61 で処理された画像を表示する機能を有している。

【0044】

また、本実施例では、半透鏡 25 と投影レンズ 31 との間に半透鏡 71 が配置されており、半透鏡 25 を反射及び透過した光束 A 及び光束 B の光の一部を

半透鏡 7 1 を介して分光器 7 2 に入射させるようにしてある。分光器 7 2 は入射した光束 A 及び光束 B の夫々の光の波長分布を測定する機能を有している。

【0045】

このように構成された本実施例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置によれば、光源 1 1 を点灯すると、光源 1 1 から発せられた光は、コレクタレンズ 1 2 を介して平行光束に変換され、半透鏡 2 1 を介して 2 つの光束 A, B に分割される。

半透鏡 2 1 を透過した光束 A は、反射鏡 2 2 A で反射した後、減光フィルタ 2 3 A を所定の透過率で透過する。さらに、励起フィルタ 2 4 A を所定の波長域の光が透過し、半透鏡 2 5 に入射する。半透鏡 2 5 を透過し、半透鏡 7 1 を透過した光束 A は、投影レンズ 3 1 を通りダイクロイックミラー 4 1 で反射し対物レンズ 4 2 を経て、試料 4 3 を照射する。試料 4 3 は光束 A の光を照射されることで励起され、蛍光を発する。

光束 A を照射することにより試料 4 3 で発した蛍光は、対物レンズ 4 2 を逆進し、ダイクロイックミラー 4 1、結像レンズ 4 4 を透過し、反射鏡 4 5 で反射し、ダイクロイックミラー 5 1 で反射する。次いで、蛍光フィルタ 5 2 A を透過し、蛍光像としてカメラ 5 3 A により撮像される。

【0046】

一方、半透鏡 2 1 で反射した光束 B は、反射鏡 2 2 B で反射した後、減光フィルタ 2 3 B を所定の透過率で透過する。さらに、励起フィルタ 2 4 B を所定の波長域で透過し、半透鏡 2 5 に入射する。半透鏡 2 5 を反射し、半透鏡 7 1 を透過した光束 B は、投影レンズ 3 1 を通りダイクロイックミラー 4 1 で反射し対物レンズ 4 2 を経て、試料 4 3 を照射する。試料 4 3 は光束 B の光を照射されることで励起され、蛍光を発する。

光束 B を照射することにより試料 4 3 で発した蛍光は、対物レンズ 4 2 を逆進し、ダイクロイックミラー 4 1、結像レンズ 4 4 を透過し、反射鏡 4 5 で反射し、ダイクロイックミラー 5 1 を透過する。次いで、蛍光フィルタ 5 2 B を透過し、蛍光像としてカメラ 5 3 B により撮像される。

【0047】

さらに、カメラ 53A 及び 53B で撮像された試料 43 の蛍光像は、画像処理部 61 においてそれらの画像間の輝度比が演算され、画像表示部 62 に原画像及びレシオ画像が表示される。

また、半透鏡 25 を経た光束 A 及び光束 B の夫々一部の光は、半透鏡 71 を反射し、分光器 72 に入射して、夫々の波長分布が監視される。

【0048】

従って、本実施例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置によれば、1 個の光源 11 のみで異なる 2 つの波長域で試料を照明することができるので、従来の複数の光源を用いた装置のように、各光源の視野ムラなどの空間的な強度分布の違いの影響を受けることなく均一な照明が可能となる。

また、1 個の光源 11 のみで異なる 2 つの波長域で試料を励起することができるので、従来の複数の光源を用いた装置のように、各光源の経時的な変化に伴う特性の変化やノイズなどの時間的な変動の違いの影響を受けることなく、レシオ画像を確実に得ることができる。

また、時間的に完全に同時に異なる 2 波長で励起した蛍光像を取得できるので、変化の速い現象や、動きの速い試料を多重蛍光観察することができる。

また、ダイクロイックミラー 41 の反射ピーク波長に合わせて最適な励起フィルタを選択することができるので、高価なデュアルピークの励起フィルタを用いる必要がなく、結果としてコストを低減することができる。

さらに、2 つの励起光強度のバランスを自由に変えることができるので、一方の励起光に対応する蛍光の強度が、他方の励起光に対応する蛍光の強度よりも極端に強い場合でも、励起光強度のバランスを調整して、双方の励起光に対応する蛍光強度を同等にすることにより、カメラのダイナミックレンジを有効に活用することができる。

また、減光フィルタを時間的に切り替える必要がなく、不要な振動の発生を抑えることができ、振動にともなう焦点位置がずれることがない。

また、分光器 72 により顕微鏡に入射する光の波長分布を確実に監視することができる。

【0049】

図2は本発明の第1実施例の変形例にかかる蛍光顕微鏡の照明部の変形例を示す概略構成図である。図1の実施例と同一の構成部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

図1に示した構成では、光束分割手段及び光束合成手段に夫々半透鏡21及び25を用いたが、それらの代わりに、図2に示すように、ダイクロイックミラー28A及び28Bを用いてもよい。ダイクロイックミラー28A及び28Bは、ある波長 λ より短波長の入射光を反射させ、波長 λ より長波長の入射光を透過させる特性を有している。

本変形例では、励起フィルタ24Aには、透過波長域が波長 λ より長波長の励起フィルタを用い、励起フィルタ24Bには、透過波長域が波長 λ より短波長の励起フィルタを用いている。

【0050】

このように構成された本変形例の照明部によれば、光源11からの光のうち波長 λ より長波長の光は、ダイクロイックミラー28Aを透過し、反射鏡22Aで反射し、減光フィルタ23A及び励起フィルタ24Aを透過し、ダイクロイックミラー28Bを透過して試料43側に導かれる。一方、光源11からの光のうち波長 λ より短波長の光は、ダイクロイックミラー28Aで反射し、反射鏡22Bで反射し、光フィルタ23B及び励起フィルタ24Bを透過し、ダイクロイックミラー28Bで反射して試料43側に導かれる。

従って、本変形例の光源部によれば、光束分割手段及び光束合成手段として図1に示したような半透鏡21、25を用いた場合に比べて、励起光のロスを最小限に抑えて試料を励起することができるので、特に暗い試料を観察する場合に有効となる。

【0051】

なお、第1実施例における半透鏡21及び25、あるいはダイクロイックミラー28A及び28Bは、光束分割手段あるいは光束合成手段の一例を示したに過ぎず、これらに限定されるものではない。光束分割手段あるいは光束合成手段のその他の例としては、例えば、2分岐バンドルファイバー（図示省略）を用いても良い。

半透鏡 2 1 の代わりに 2 分岐バンドルファイバーを用いる場合、バンドルファイバーの合成端をコレクタレンズ 1 2 の直後に配置し、また、バンドルファイバーの分岐端を夫々反射鏡 2 2 A, 2 2 B の直前に配置すればよい。

このようにすれば、光源 1 1 から発せられた光をコレクタレンズ 1 2 により完全に平行光束にしなくても、バンドルファイバーに入射させることができれば、反射鏡 2 2 A, 2 2 B に入射させることができるので、光学系の調整が容易になる。

【 0 0 5 2 】

さらに、半透鏡 2 5 にかえて 2 分岐バンドルファイバーを用いた場合、バンドルファイバーの分岐端を夫々励起フィルタ 2 4 A 及び 2 4 B の直後に配置すればよい。

このようにすれば、励起フィルタ 2 4 A 及び 2 4 B を透過した光がバンドルファイバーの分岐端の夫々に入射できるようにすれば合成できるので、減光フィルタ 2 3 A, 2 3 B, 励起フィルタ 2 4 A, 2 4 B の配置の自由度を大きくすることができる。

【 0 0 5 3 】

なお、第 1 実施例における励起フィルタ 2 4 A 及び 2 4 B は、波長選択手段の一例を示したに過ぎず、これらに限定されるものではない。波長選択手段のその他の例としては、例えば、励起フィルタ 2 4 A 及び 2 4 B の代わりにモノクロメータを用いても良い。このようにすれば、複数の励起フィルタを予め用意しておく必要がなくなる。

【 0 0 5 4 】

また、ダイクロイックミラー 5 1 の代わりに半透鏡を用いてもよい。この場合、半透鏡はその反射率及び透過率の波長特性がほとんど一様であるので、ダイクロイックミラー 5 1 を用いる場合のような、試料内の蛍光物質を変えるごとにその蛍光に応じて透過あるいは反射させる特性を持つダイクロイックミラー 5 1 に交換しなければならないというような手間を省くことができる。

【 0 0 5 5 】

第 2 実施例

図3は本発明の第2実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。図1の実施例と同一の構成部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

第2実施例では、半透鏡21を透過した光束Aの光路上には、反射鏡22A、減光フィルタ23A、励起フィルタ24Aに加えて、偏光板26Aが配置されている。また、半透鏡21で反射した光束Bの光路上には、反射鏡22B、減光フィルタ23B、励起フィルタ24Bに加えて、偏光板26Bが配置されている。偏光板26A及び26Bは、光源11からの入射光束の偏光方向を選択する特性を有している。

【0056】

また、第2実施例では、反射鏡45の反射側の光路上に蛍光フィルタ52と、蛍光フィルタ52を透過した光束を光束A'と光束B'とに分割する半透鏡56が配置され、半透鏡56を介して分割された2つの光束A', B'の光路上に偏光板54A, 偏光板54Bが配置されており、偏光板54A及び54Bを透過した蛍光が夫々カメラ53A, 53Bで撮像されるようになっている。

蛍光フィルタ52は、試料43からの光のうち特定の波長域のみの光を透過させる特性を有している。

偏光板54A及び54Bは、半透鏡56で分割された光束A'及び光束B'の夫々を特定の偏光方向の成分の光のみを透過させる特性を有している。

【0057】

ここで、偏光板26Aと偏光板26B、偏光板54Aと偏光板54Bの透過偏光軸の方向関係について述べる。

偏光板26Aと偏光板26Bとは、透過偏光軸が互いに垂直になっており、偏光板54Aと偏光板54Bとは、透過偏光軸が互いに垂直になっている。また、偏光板26Aと偏光板54Aとは、透過偏光軸が互いに平行になっており、偏光板26Bと偏光板54Bとは、透過偏光軸が互いに平行になっている。

このようにすると、偏光板26Aを透過した所定の偏光方向を有する光束Aによって励起された試料43の蛍光の偏光方向は、励起光(光束A)の偏光方向と平行の成分が支配的であるので、その成分は偏光板54Aを透過することができ

るが、偏光板 54B を透過することはできない。また逆に、試料 43 の蛍光のうち、励起光（光束 A）の偏光方向と垂直な成分は、偏光板 54B を透過することができるが、偏光板 54A を透過することはできない。他方、偏光板 26B を透過した所定の偏光方向を有する光束 B によって励起された試料 43 の蛍光の偏光方向は、励起光（光束 B）の偏光方向と平行の成分が支配的であるので、その成分は、偏光板 54B を透過することができるが、偏光板 54A を透過することはできない。また逆に、試料 43 の蛍光のうち、励起光（光束 B）の偏光方向と垂直な成分は、偏光板 54A を透過することができるが、偏光板 54B を透過することはできない。

【0058】

このように構成された本実施例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置によれば、光源 11 を点灯すると、光源 11 から発せられた光は、コレクタレンズ 12 を介して平行光束に変換され、半透鏡 21 に入射し、2 つの光束 A、B に分割される。

半透鏡 21 を透過した光束 A は、反射鏡 22A で反射した後、減光フィルタ 23A を所定の透過率で透過する。また、励起フィルタ 24A を所定の波長域の光が透過し、さらに、偏光板 25A を介して所定の偏光方向の成分の光が選択され、半透鏡 25 に入射する。半透鏡 25 を透過し、半透鏡 71 を透過した光束 A は、投影レンズ 31 を通りダイクロイックミラー 41 で反射し対物レンズ 42 を経て、試料 43 を照射する。試料 43 は光束 A の光を照射されることで励起され、蛍光を発する。

なお、本実施例においては、試料 43 内における蛍光物質として、GFP（緑色蛍光タンパク質）や RFP（赤色蛍光タンパク質）等のように分子量が大きな蛍光物質を用いる。分子量が大きいと、蛍光物質の回転運動が遅く、試料 43 から発した蛍光の偏光方向は、試料に照射した励起光の偏光方向と平行な成分が支配的であり、また、その平行な成分と励起光の偏光方向と垂直な成分の比は、ほぼ一定となる。

光束 A を照射することにより試料 43 で発された蛍光は、対物レンズ 42 を逆進し、ダイクロイックミラー 41、結像レンズ 44 を透過し、反射鏡 45 で反射

し、蛍光フィルタ 52 を透過し、半透鏡 56 で透過及び反射する。次いで、蛍光のうち光束 A の偏光方向と平行な成分は、偏光板 54 A を透過し、蛍光像としてカメラ 53 A により撮像され、垂直な成分は、偏光板 54 B を透過し、蛍光像としてカメラ 53 B により撮像される。

【0059】

一方、半透鏡 21 で反射した光束 B は、反射鏡 22 B で反射した後、減光フィルタ 23 B で所定の透過率で透過する。また、励起フィルタ 24 B を所定の波長域の光が透過し、さらに、偏光板 25 B を介して所定の偏光方向の成分の光が選択され、半透鏡 25 に入射する。半透鏡 25 で反射し、半透鏡 71 を透過した光束 B は、投影レンズ 31 を通りダイクロイックミラー 41 で反射し対物レンズ 42 を経て、試料 43 を照射する。試料 43 は光束 B の光を照射されることで励起され、蛍光を発する。

光束 B を照射することにより試料 43 で発された蛍光は、対物レンズ 42 を逆進し、ダイクロイックミラー 41、結像レンズ 44 を透過し、反射鏡 45 で反射し、蛍光フィルタ 52 を透過し、半透鏡 56 を透過及び反射する。次いで、蛍光のうち光束 B の偏光方向と平行な成分は、偏光板 54 B を透過し、蛍光像としてカメラ 53 B により撮像され、垂直な成分は、偏光板 54 A を透過し、蛍光像としてカメラ 53 A により撮像される。

【0060】

次に、本実施例の構成、作用による効果について説明する。

GFP のように励起スペクトルが双峰型でかつ、その励起スペクトルの形が、例えばカルシウムイオンの濃度に依存して変化するような蛍光物質を用いる場合、従来では、当該双峰に対応する 2 つの波長の励起光を同時にあて、発する蛍光からカルシウムイオンの濃度の変化を抽出することは、困難であった。

しかし、本実施例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置によれば、上述したように偏光方向が互いに直行する 2 つの波長の励起光で同時に試料を励起して蛍光を発生させ、その蛍光のうち、偏光方向が互いに直交する 2 成分を 2 つのカメラで同時に撮像した後、得られた 2 つの画像をもとに演算すると、それぞれの波長の励起光で単独に励起した場合に得られる蛍光像と同

等な蛍光像を分離して求めることができる。さらには、得られた2つの画像の比を計算してレシオ画像を測定することにより、例えば、カルシウムイオンの濃度の変化を時間のずれをまったく生じずに完全に同一の時間で測定することができ、変化が早い現象や動きの速い試料でも測定することが可能となる。

【0061】

なお、第2の実施例においては、偏光方向選択手段として偏光板26A及び26Bを用いたが、これらの代わりに偏光ビームスプリッタを用いても良い。

図4は本発明の第2実施例の変形例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。図1及び図3と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

本変形例では、図1に示した半透鏡21及び25の代わりに、図4に示すように、偏光ビームスプリッタ27A、27Bを用いている。

偏光ビームスプリッタ27Aは、コレクタレンズ12を経た平行光束が入射する位置に配置されている。偏光ビームスプリッタ27Aは、入射光束のうち紙面に対して平行な偏光方向の成分の光を透過し、紙面に対して垂直な偏光方向の成分の光を反射する特性を有し、入射光束をその偏光方向に応じて光束A、Bに分割するように構成されている。

そして、偏光ビームスプリッタ27Aを透過した光束Aの光路上には、反射鏡22Aと、減光フィルタ23Aと、励起フィルタ24Aが配置されている。また、偏光ビームスプリッタ27Aで反射した光束Bの光路上には、反射鏡22Bと、減光フィルタ23Bと、励起フィルタ24Bが配置されている。

【0062】

偏光ビームスプリッタ27Bは、励起フィルタ24Aを経た光束A及び励起フィルタ24Bを経た光束Bが入射する位置に配置されている。そして、偏光ビームスプリッタ27Bは、偏光ビームスプリッタ27Aと同様な機能を有し、紙面に対して平行な偏光成分を有する光束Aを透過し、紙面に対して垂直な偏光方向の成分を有する光束Bを反射することにより、光束A及び光束Bを合成する。

また、本変形例では、反射鏡45の反射側の光路上に蛍光フィルタ52と、蛍光フィルタを透過した光束を偏光方向の違いによって光束A'と光束B'とに分

割する偏光ビームスプリッタ 55 が配置され、偏光ビームスプリッタ 55 で分割された蛍光が夫々カメラ 53 A, 53 B で撮像されるようになっている。

偏光ビームスプリッタ 55 は、入射光束のうち紙面に対して平行な偏光方向の成分の光を透過し、紙面に対して垂直な偏光方向の成分の光を反射する特性を有し、入射光束をその偏光方向に応じて光束 A', B' に分割するように構成されている。

【0063】

このように構成された本変形例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置によれば、偏光ビームスプリッタ 27 A 及び 27 B が、偏光方向選択手段の機能に加えて、光束分割手段及び光束合成手段の機能をも兼ね備えるので、半透鏡 21 及び半透鏡 25 を省略することができ、光学系の簡素化が可能となる。また、本変形例では、偏光ビームスプリッタ 27 A, 27 B を用いると、半透鏡 21, 25 を用いるのに比べて、光源 11 からの光のロスが少なくなるので、効率良く試料に光を照射することができる。また、偏光ビームスプリッタ 55 が、図 3 における半透鏡 51 及び偏光板 54 A 及び 54 B の役割を果たすので、光学系の簡素化が図れるのみならずシステムの安定性の向上が図れる。また、偏光ビームスプリッタ 55 を用いると、半透鏡 56 を用いるのに比べて、試料から発した光のロスが少なくなるので、効率よく蛍光を検出することができる。

また、本変形例によれば、1 個の光源 11 のみで異なる 2 つの波長域で試料を励起することができるので、図 1, 2 に示した第 1 実施例と同様な効果を奏する。また、図 3 に示した構成と同様の効果を有する。

【0064】

第 3 実施例

図 5 は本発明の第 3 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。図 1 の実施例と同一の構成部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

第 3 実施例では、図 1 に示した第 1 実施例の装置におけるダイクロイックミラー 41 に代えて半透鏡 46 が配置されている。半透鏡 46 は、入射した光の一部

を反射し、一部を透過する機能を有し、その反射率及び透過率の波長依存性がほとんどないという特性を有している。そして、半透鏡 25 で合成された光束 A 及び光束 B の一部を対物レンズ 42 側に反射させるとともに、試料 43 から発した蛍光の一部を透過させている。

【0065】

このように構成された本実施例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置によれば、反射率及び透過率に波長依存性がほとんどない半透鏡 46 を用いたので、ダイクロイックミラー 41 を用いた実施例のように反射特性に制約されることがなく、試料 43 に用いる蛍光物質に合わせて励起フィルタ及び蛍光フィルタを最適に選択することができる。また、高価なデュアルダイクロイックミラーを用いる必要がないため、コストを低減させることができる。

また、1 個の光源 11 のみで異なる 2 つの波長域で試料を励起することができるので、第 1 の実施の形態と同様な効果を奏する。

【0066】

第 4 実施例

図 6 は本発明の第 4 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。図 1 の実施例と同一の構成部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

第 4 実施例は、半透鏡 71 から反射鏡 45 に至るまでの光路上の構成が図 1 に示した第 1 実施例と異なっており、この間の光路上には、投影レンズ 31 と、反射鏡 47 と、第 1 の対物レンズである対物レンズ 42 A と、第 2 の対物レンズである対物レンズ 42 B と、結像レンズ 44 が配置されており、透過型の蛍光観察を行なうように構成されている。

投影レンズ 31 は、半透鏡 25 で合成された光束 A 及び光束 B の光源像を第 1 の対物レンズ 42 A の瞳面に導いている。反射鏡 47 は、投影レンズ 31 を透過した光を反射させて対物レンズ 42 A に導いている。対物レンズ 42 A は、半透鏡 25 で合成された光束を試料 43 に照射するように配置されている。対物レンズ 42 B は、試料 43 を挟んで対物レンズ 42 A に対向して配置されており、試料 43 から発した蛍光を透過し、結像レンズ 44 を介して反射鏡 45 で反射させ

ることによってカメラ 53A 及び 53B の撮像面上に結像させるようになっている。また、第 1 の対物レンズ 42A は光軸方向に沿って上下動して試料 43 に照射する光の径を調整することができるようになっている。

【0067】

このように構成された本実施例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置によれば、励起光と蛍光とが別の光路を辿るため、図 1 に示したダイクロイックミラー 41 あるいは図 5 に示した半透鏡 46 を用いて励起光と蛍光とを分離する必要がない。このため、励起光及び蛍光を効率良く伝送することができるので、特に暗い蛍光試料を観察する場合に有効である。また、高価なデュアルダイクロイックミラーを用いる必要がないため、コストを低減させることができる。

また、1 個の光源 11 のみで異なる 2 つの波長域で試料を励起することができるので、第 1 の実施の形態と同様な効果が得られる。

なお、第 4 実施例においても、顕微鏡の照明部を図 2 に示したような構成にすることはもちろん可能であり、その場合には同様の効果が得られる。

【0068】

第 5 実施例

図 7 は本発明の第 5 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。図 3 の実施例と同一の構成部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

第 5 実施例は、半透鏡 25、半透鏡 71 から反射鏡 45 に至るまでの光路上の構成が図 3 に示した第 2 実施例と異なり、この間の光路上には、第 4 実施例と同様に、投影レンズ 31 と、反射鏡 47 と、第 1 の対物レンズである対物レンズ 42A と、第 2 の対物レンズである対物レンズ 42B と、結像レンズ 44 が配置されている。

【0069】

このように構成された本実施例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置によれば、第 4 実施例と同様に、励起光と蛍光とが別の光路を辿るため、図 3 に示したダイクロイックミラー 41 あるいは半透鏡を用いて励起

光と蛍光とを分離する必要がなくなる。このため、励起光及び蛍光を効率良く伝送することができ、特に暗い蛍光試料を観察する場合に有効である。また、高価なデュアルダイクロイックミラーを用いる必要がないため、コストを低減させることができる。

その他の効果は、図 3 に示した第 2 実施例とほぼ同じである。

【0070】

第 6 実施例

図 8 は本発明の第 6 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。図 4 の実施例と同一の構成部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

第 6 実施例は、偏光ビームスプリッタ 27B、半透鏡 71 から反射鏡 45 に至るまでの光路上の構成が図 4 に示した第 2 実施例の変形例と異なり、この間の光路上には、投影レンズ 31 と、反射鏡 47 と、第 1 の対物レンズである対物レンズ 42A と、第 2 の対物レンズである対物レンズ 42B と、結像レンズ 44 が配置されている。

【0071】

このように構成された本実施例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置によれば、第 4 実施例と同様に、励起光と蛍光とが別の光路を辿るため、図 4 に示したダイクロイックミラー 41 あるいは半透鏡を用いて励起光と蛍光とを分離する必要がなくなる。このため、励起光及び蛍光を効率良く伝送することができるので、特に暗い蛍光試料を観察する場合に有効となる。また、高価なデュアルダイクロイックミラーを用いる必要がないため、コストを低減させることができる。

その他の効果は、図 4 に示した第 2 実施例の変形例とほぼ同じである。

【0072】

第 7 実施例

図 9 は本発明の第 7 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。図 1 の実施例と同一の構成部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

第 7 実施例では、半透鏡 2 1 及び半透鏡 8 1 を介して、光源 1 1 から出射された光束を 3 つの照射光の光束に分岐し、励起フィルタ 2 4 A ~ 2 4 C を介してこれらの光束分割手段により分岐された夫々の照明光の波長を選択するとともに、半透鏡 8 2 及び半透鏡 2 5 を介して、波長が選択された複数の照射光の光束を単一の光束に合成するように構成されている。

【 0 0 7 3 】

コレクタレンズ 1 2 を介して平行光束に変換された光は、光束分割手段である半透鏡 2 1 に入射する。半透鏡 2 1 は、入射光束の一部を反射させ、残りを透過させる特性を有している。

半透鏡 2 1 を透過した光束 A の光路上には、光束分割手段としての半透鏡 8 1 が配置されている。半透鏡 8 1 は、入射光束の一部を反射させ、残りを透過させる特性を有している。

半透鏡 8 1 を透過した光束 A の光路上には、反射鏡 2 2 A と、減光フィルタ 2 3 A と、励起フィルタ 2 4 A が配置されている。

また、半透鏡 8 1 で反射した光束 C の光路上には、減光フィルタ 2 3 C、励起フィルタ 2 4 C と、半透鏡 8 2 が配置されている。

一方、半透鏡 2 1 で反射した光束 B の光路上には、減光フィルタ 2 3 B と、励起フィルタ 2 4 B と、反射鏡 2 2 B が配置されている。

【 0 0 7 4 】

反射鏡 2 2 A、2 2 B、半透鏡 8 1、8 2 には、光束 A、光束 B、光束 C が半透鏡 2 5 を経た後の進行方向及び光路上の位置を完全に一致させるための傾き調整機構（不図示）が備えられている。

減光フィルタ 2 3 A、2 3 B、2 3 C は、夫々光束 A の光量、光束 B の光量、及び光束 C の光量を独立して調整することができるようになっている。

また、減光フィルタ 2 3 A、2 3 B、及び 2 3 C は、夫々ターレット又はスライダーを介して光束 A、光束 B、及び光束 C の光路に容易に挿脱可能に設けられている。

励起フィルタ 2 4 A、2 4 B、及び 2 4 C は、夫々光束 A、光束 B、及び光束 C における特定の波長域の光のみを透過させる特性を有しており、夫々ターレ

ト又はスライダーを介して光束A、光束B、及び光束Bの光路に容易に挿脱可能に設けられている。

【0075】

半透鏡82は、入射光の一部を透過させ一部を反射させる特性を有しており、半透鏡82を透過した平行光束Bと、半透鏡を反射した平行光束Cが合成されて半透鏡25に入射するように構成されている。更に、半透鏡25は、入射光の一部を透過させ一部を反射させる特性を有しており、半透鏡25を透過した平行光束Aと半透鏡25を反射した平行光束B及びCは合成されるようになっている。その際、上述の傾き調整機構を介して反射鏡22A、反射鏡22B、半透鏡81及び82の傾き調整が施されることにより、半透鏡25を通った平行光束A、B及びCは進行方向及び光路上の位置が完全に一致している。

【0076】

また、本実施例では、ダイクロイックミラー41には、反射ピークが3つ以上ある反射特性を有するマルチクロイックミラーが用いられている。そして、励起フィルタ24A、24B及び24Cは、ダイクロイックミラー41の反射ピークに合わせて選択されている。

また、本実施例では、カメラ91として、試料43からの蛍光を3つの波長成分に分割して撮像する3板式のカラーCCDカメラが用られており、図1の実施例に示したようなダイクロイックミラー51や蛍光フィルタ52A、52Bに相当する光学部材は省かれている。

【0077】

このように構成された本実施例の蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置によれば、1個の光源11のみで異なる3つの波長域で試料を励起することができるので、上記第1実施例と同様な効果を奏する。さらに、3つ以上の波長域で試料を同時に励起し、3つ以上の蛍光を同時に観察することができるので、例えば、カルシウムイオン濃度の変化に加えて、クロライドイオン濃度の変化も同時に観察することができるといった効果が得られる。

なお、本実施例では照明光束を3つに分割する例を示したが、4つ以上の分割も可能である。また、ダイクロイックミラー41の代わりに半透鏡を用いれば、

第3実施例と同様の効果が得られる。

【0078】

なお、図9の例では、カメラ91として、試料43からの蛍光を3つの波長成分に分割して撮像する3板式のカラーCCDカメラを用いたが、図1の実施例に示したようなダイクロイックミラー51を用いて3つの光路に分割し、夫々の光路に蛍光フィルタと、単板式のCCDカメラを配置してもよい。

図10は第7実施例の変形例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。図9の実施例と同一の構成部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

本変形例では、反射鏡45の反射側の光路上にダイクロイックミラー51が配置されて、反射鏡45で反射された光束を光束B'とそれ以外の光束に分割するとともに、さらに、ダイクロイックミラー51を透過した光束の光路上にダイクロイックミラー51'が配置されており、ダイクロイックミラー51を透過した光束を光束A'、光束C'に分割している。

そして、分割された夫々の光束A'、B'、C'の光路上には、夫々特定の波長域のみを透過させる蛍光フィルタ52A、52B、52Cと、カメラ53A、53B、53Cが設けられている。カメラ53A、53B、53Cには、それぞれ単板式のCCDカメラが用いられている。

本変形例のように構成すれば、図9に示した3板式のCCDカメラを用いた場合と比べて単板式のCCDカメラが安価であるため、装置全体の製造コストを低減することができる。

また、3つに分割された光束A'、B'、C'の光路に夫々蛍光フィルタを配置する構成であるため、試料内の蛍光物質を変えても、その蛍光に応じた特性を備えた蛍光フィルタを光束A'、B'、C'の光路に挿脱することができ、3板式CCDカメラを用いる場合のようにCCDカメラを取りかえることなく蛍光撮影ができる。

その他の効果は図9に示した実施例と同様である。

【0079】

なお、図9及び図10に示した第10実施例の構成は、半透鏡25、半透鏡7

1 から反射鏡 4 5 に至るまでの光路上の構成に関し、図 6 の実施例に示したように、投影レンズ 3 1 と、反射鏡 4 7 と、第 1 の対物レンズである対物レンズ 4 2 A と、第 2 の対物レンズである対物レンズ 4 2 B と、結像レンズ 4 4 が配置された構成の装置においても適用可能である。

【0 0 8 0】

以上説明したように、本発明の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置は、特許請求の範囲に記載された発明の他に、次に示すような特徴も備えている。

【0 0 8 1】

(1) 前記複数の照射光のうちの少なくともいずれかの照明光の強度を調整する光量調整手段を更に備えることを特徴とする請求項 3 又は 5 に記載の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0 0 8 2】

(2) 前記第 1 の照射光の強度を調整する第 1 の光量調整手段と前記第 2 の照射光の強度を調整する第 2 の光量調整手段の双方またはいずれか一方を更に備えることを特徴とする請求項 4 又は 6 に記載の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0 0 8 3】

(3) 前記複数の照射光のうちの少なくともいずれかの照明光の偏光方向を選択する偏光方向選択手段を更に備えることを特徴とする請求項 3 又は 5 に記載の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0 0 8 4】

(4) 前記第 1 の照射光の偏光方向を選択する第 1 の偏光方向選択手段と前記第 2 の照射光の偏光方向を選択する第 2 の偏光方向選択手段の双方またはいずれか一方を更に備えることを特徴とする請求項 4 又は 6 に記載の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0 0 8 5】

(5) 前記複数の照射光のうちの少なくともいずれかの照明光の波長分布を監視する波長分布監視手段を更に備えることを特徴とする請求項 3 又は 5 に記載の顕

微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0086】

(6) 前記第1及び前記第2の照射光の双方または一方の波長分布を監視する波長分布監視手段を更に備えることを特徴とする請求項4又は6に記載の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0087】

(7) 前記ミラーが半透鏡であることを特徴とする請求項3又は4に記載の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0088】

(8) 前記光束分割手段及び前記光束合成手段がダイクロイックミラーであることを特徴とする請求項3～6のいずれかに記載の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0089】

(9) 前記光束分割手段及び前記光束合成手段が偏光ビームスプリッタであることを特徴とする請求項3～6のいずれかに記載の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0090】

(10) 前記複数の波長選択手段のうちの少なくともいずれかが、前記光路分岐手段により分岐された光路上に挿脱可能に配置されることを特徴とする請求項3、5、上記(1)、(3)、(5)のいずれかに記載の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0091】

(11) 前記第1の波長選択手段と前記第2の波長選択手段の少なくともいずれかが、前記光路分岐手段により分岐された光路上に挿脱可能に配置されることを特徴とする請求項4、6、上記(2)、(4)、(6)のいずれかに記載の顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置。

【0092】

【発明の効果】

本発明によれば、標本に複数の波長の光を同時にかつ同一の照射強度分布で照

射することができ、夫々の光の波長や強度を独立して設定することができる顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の第 1 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。

【図 2】

本発明の第 1 実施例の変形例にかかる蛍光顕微鏡の照明部の変形例を示す概略構成図である。

【図 3】

本発明の第 2 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。

【図 4】

本発明の第 2 実施例の変形例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。

【図 5】

第 3 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。

【図 6】

本発明の第 4 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。

【図 7】

本発明の第 5 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。

【図 8】

本発明の第 6 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。

【図 9】

本発明の第 7 実施例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた

画像処理装置の概略構成図である。

【図 10】

第 7 実施例の変形例にかかる蛍光顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置の概略構成図である。

【図 11】

従来の多重蛍光標本を励起するための複数波長による照明光を標本に照射する一手段を示す概略構成図である。

【図 12】

従来の多重蛍光標本を励起するための複数波長による照明光を標本に照射する他の手段を示す概略構成図である。

【図 13】

単一の光源からの光を分割して標本に照射するようにした装置の従来例を支援す概略構成図である。

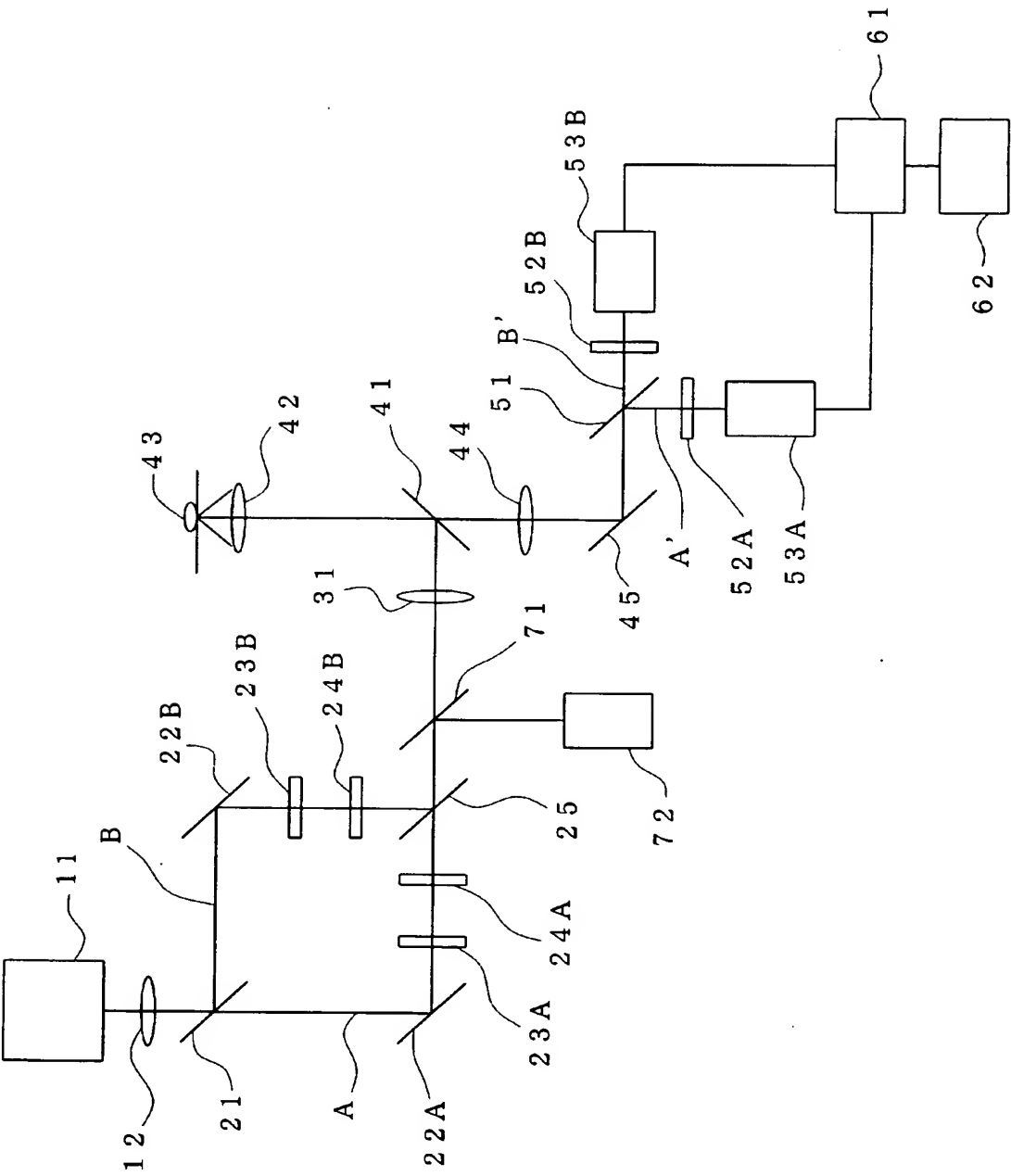
【符号の説明】

1 1	光源
1 2	コレクタレンズ
2 1, 2 5, 5 6, 4 6, 7 1, 8 1, 8 2	半透鏡
2 2 A, 2 2 B, 4 5, 4 7	反射鏡
2 3 A, 2 3 B, 2 3 C	減光フィルタ
2 4 A, 2 4 B, 2 4 C	励起フィルタ
2 6 A, 2 6 B, 5 4 A, 5 4 B	偏光板
2 7 A, 2 7 B, 5 5	偏光ビームスプリッタ
3 1	投影レンズ
2 8 A, 2 8 B, 4 1, 5 1, 5 1'	ダイクロイックミラー
4 2, 4 2 A, 4 2 B	対物レンズ
4 3	試料
4 4	結像レンズ
5 2, 5 2 A, 5 2 B, 5 2 C	蛍光フィルタ
5 3 A, 5 3 B, 5 3 C	カメラ

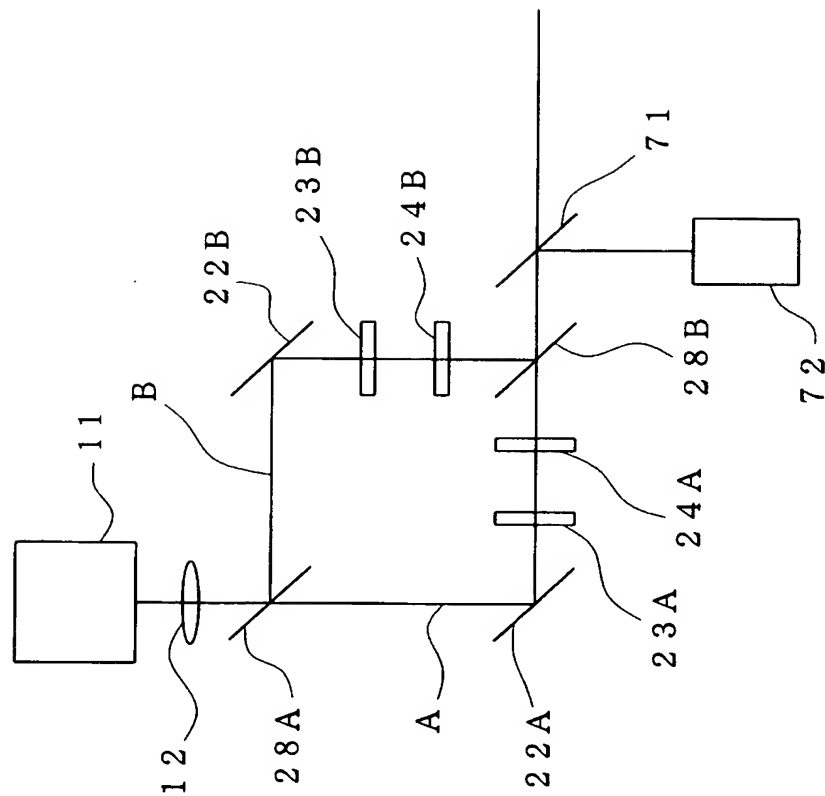
9 1	3 板式 C C D カメラ	
6 1	画像処理部	
6 2	画像表示部	
7 2	分光器	
1 5 1	フィルタ切換手段	
1 5 1 a	励起光選択用フィルタ	
1 5 1 b	回転円板	
1 5 2 a	蛍光選択用フィルタ	
1 5 8, 1 6 4		ダイクロイックミラー
1 6 1 A, 1 6 1 B		白色光源
1 6 2 A, 1 6 2 B		コレクタレンズ
1 6 3 A, 1 6 3 B		励起フィルタ
1 6 5	観察光学系	
1 7 1	照射用光源	
1 7 2	分岐光学系	
1 7 3	試料	

【書類名】 図面

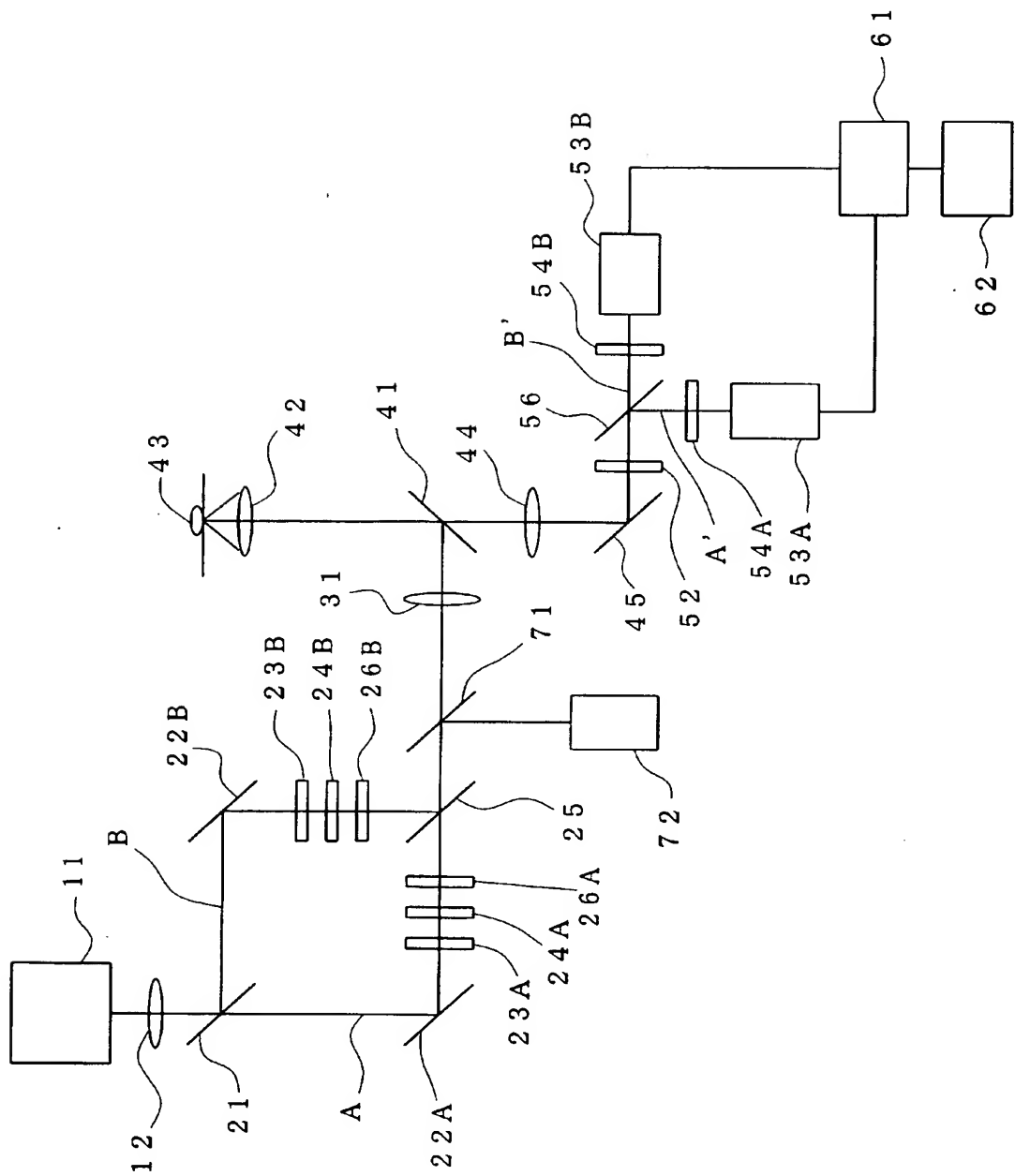
【図 1】



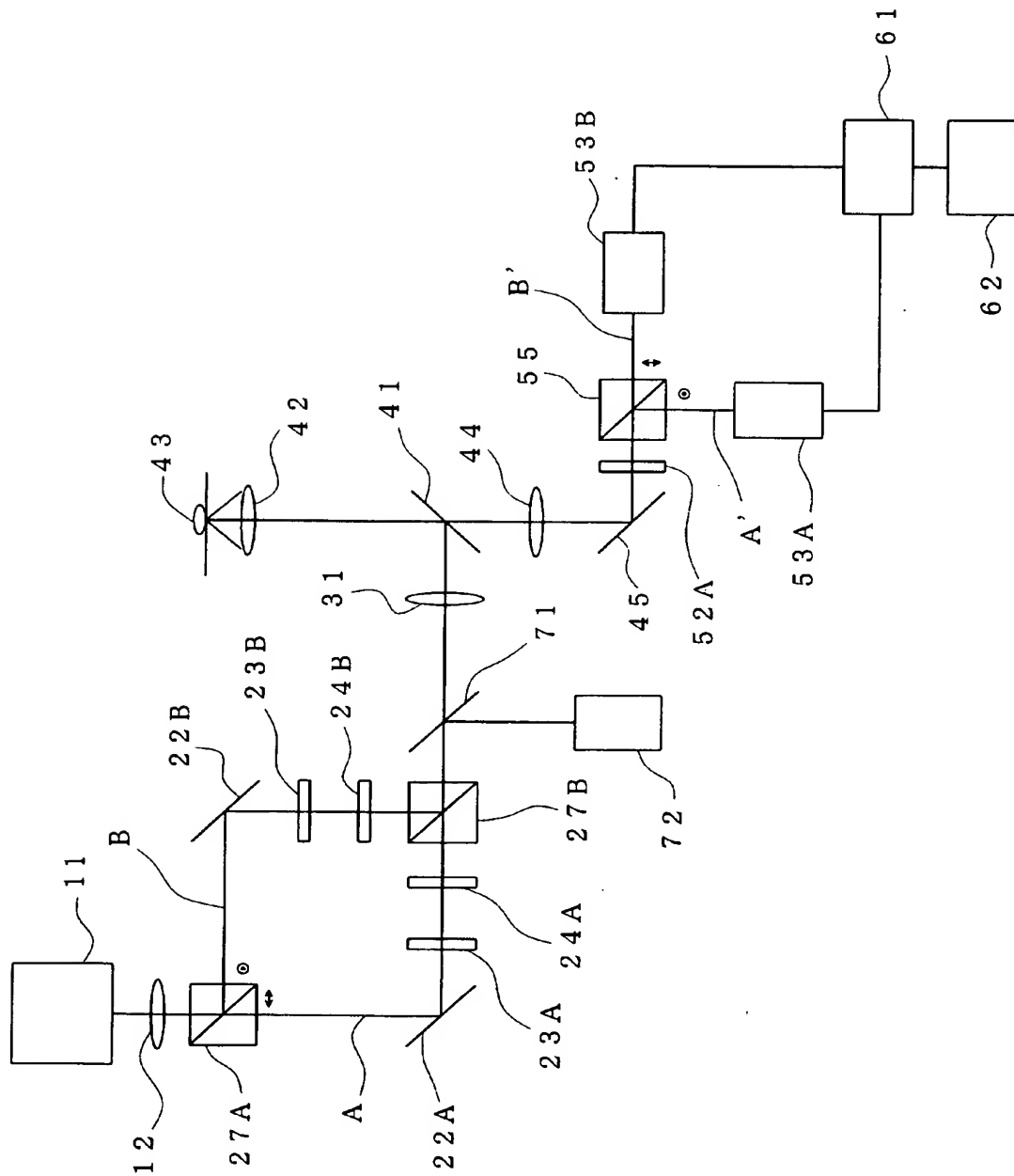
【図 2】



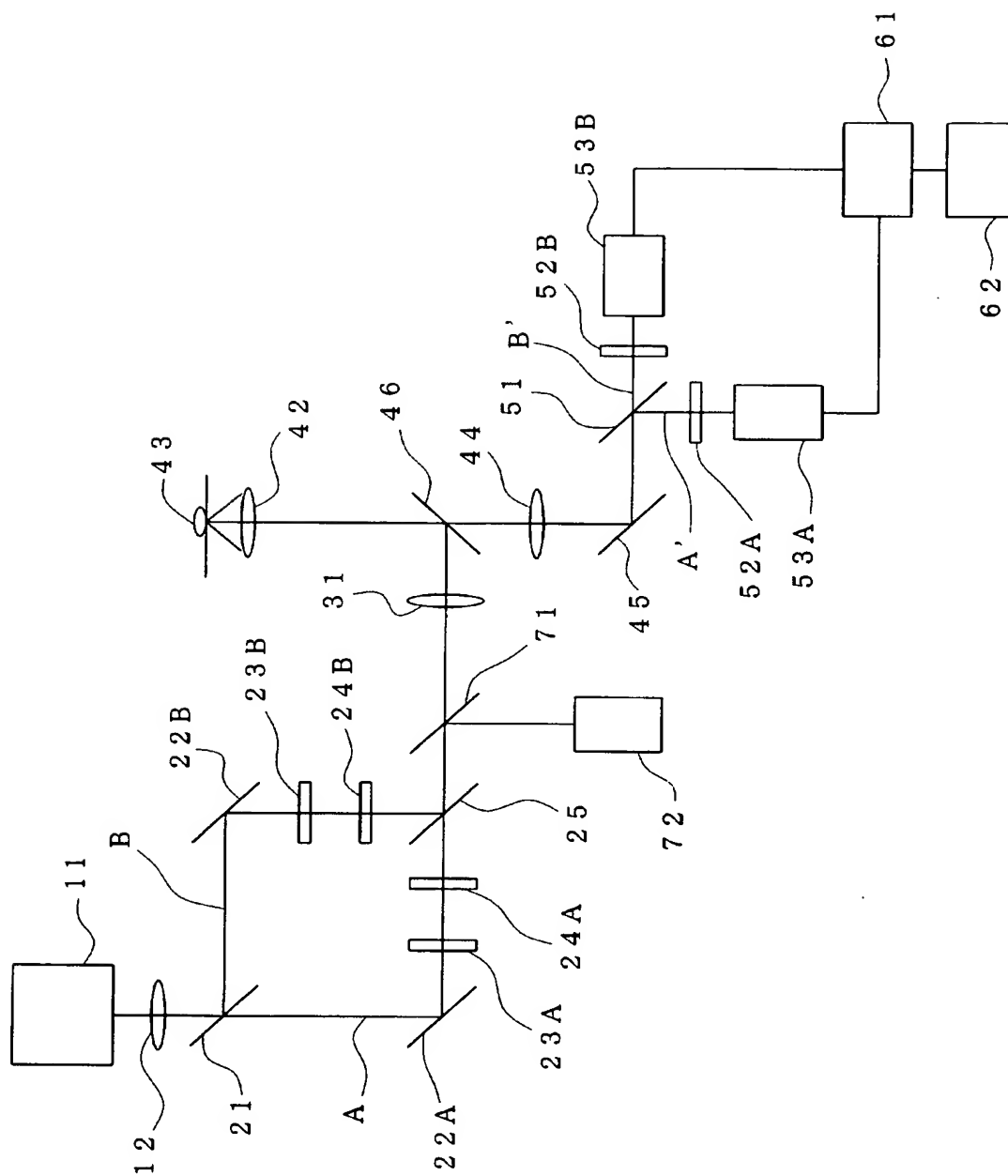
【図 3】



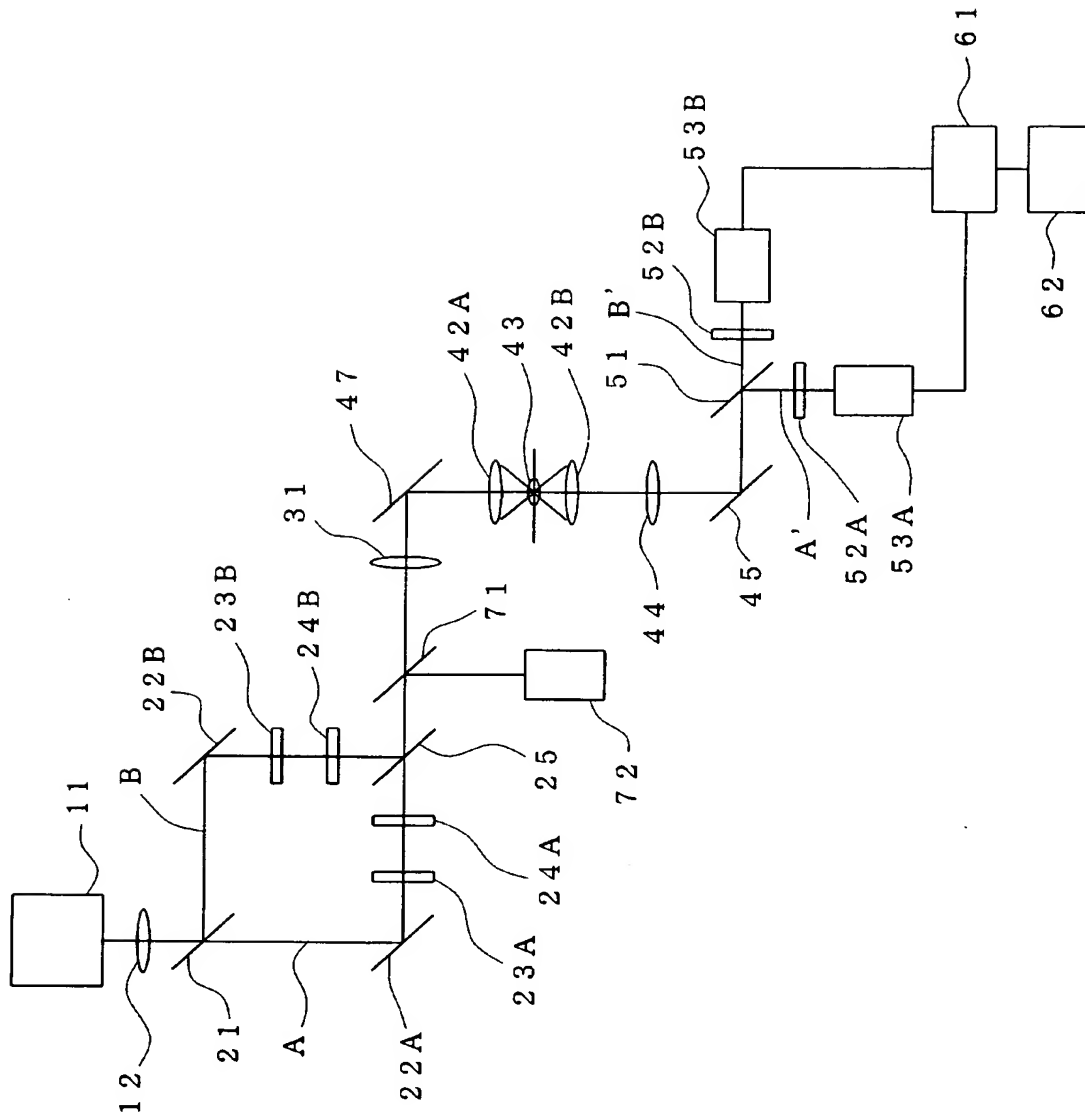
【図 4】



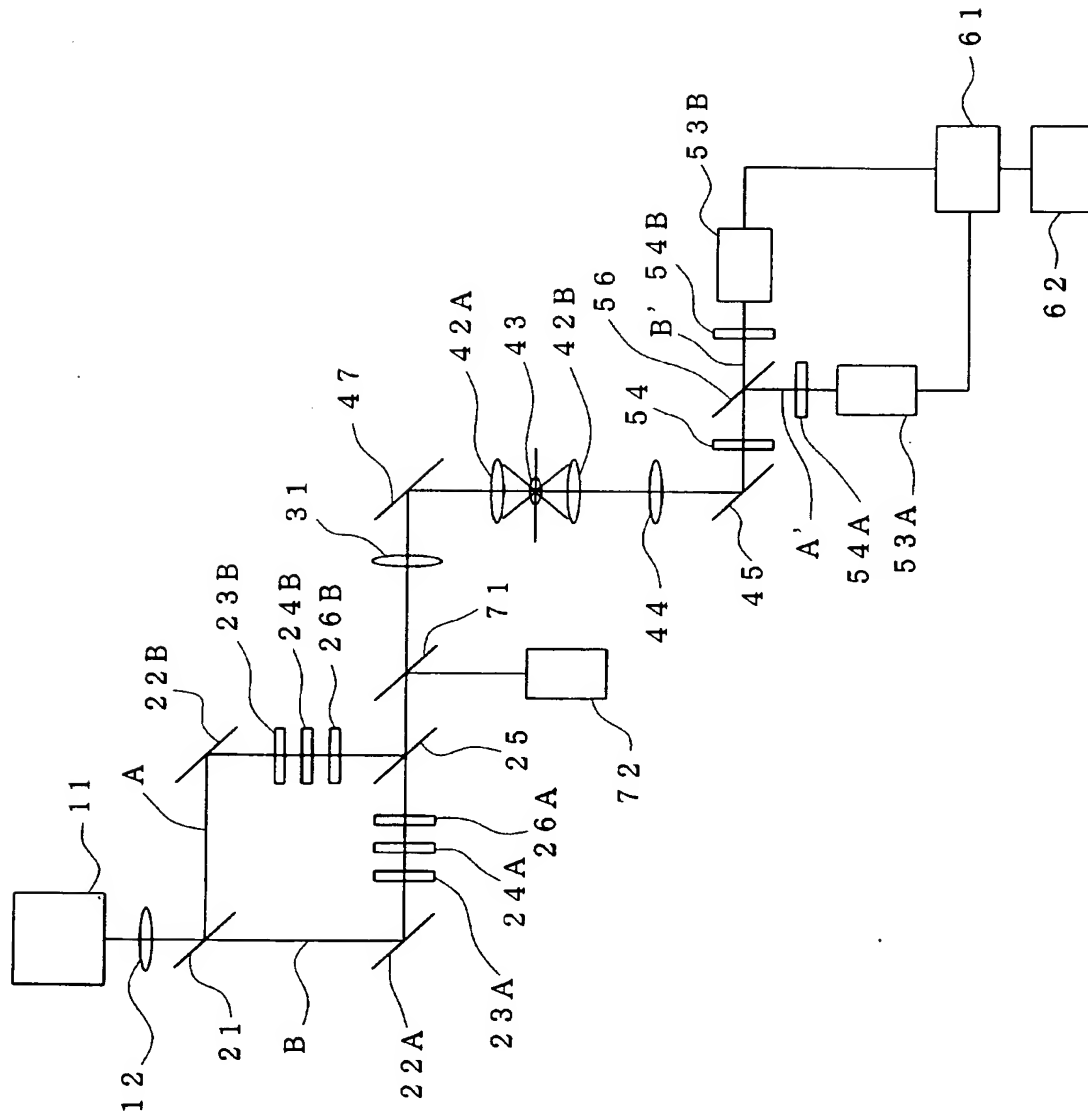
【図 5】



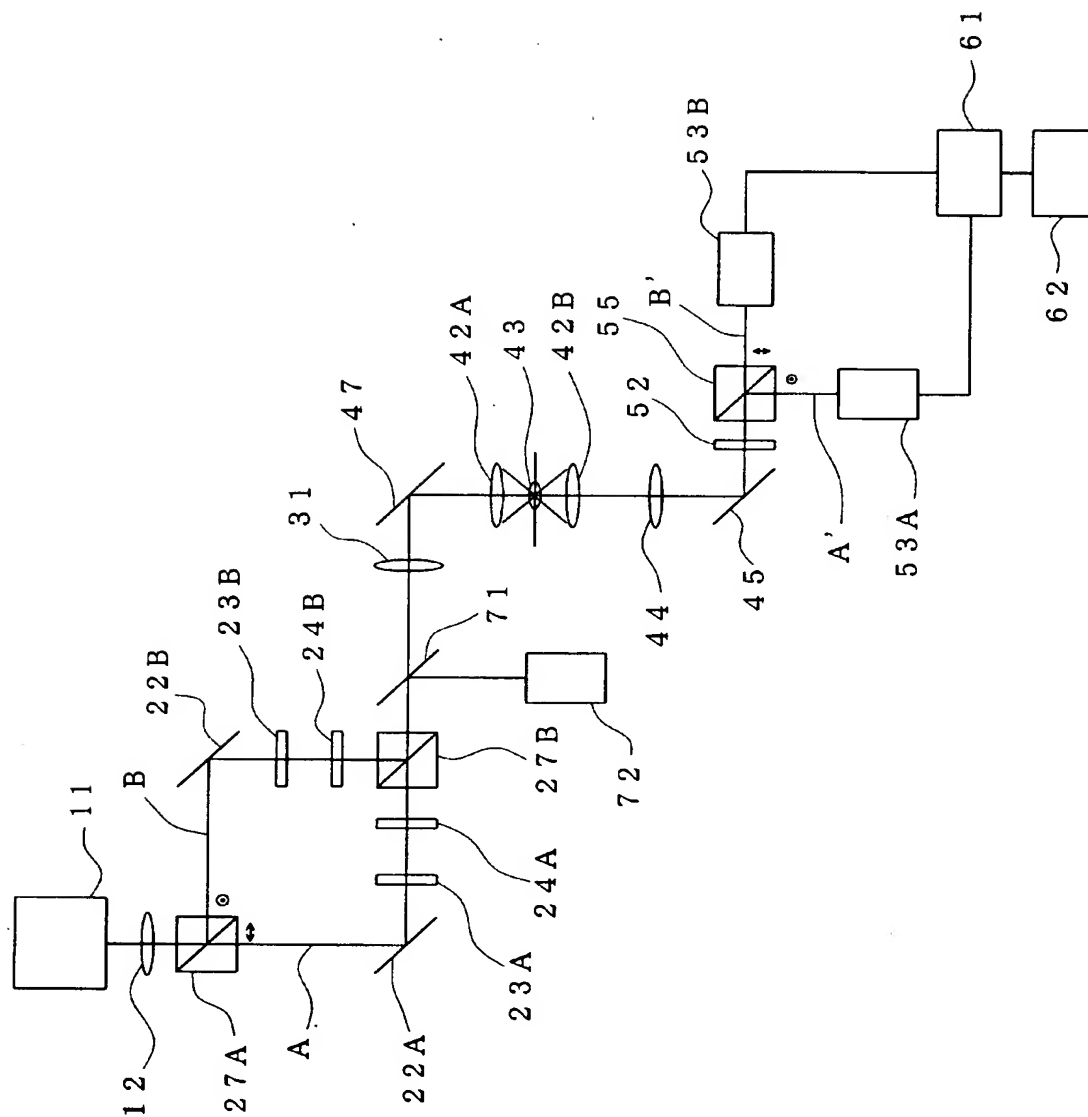
【図 6】



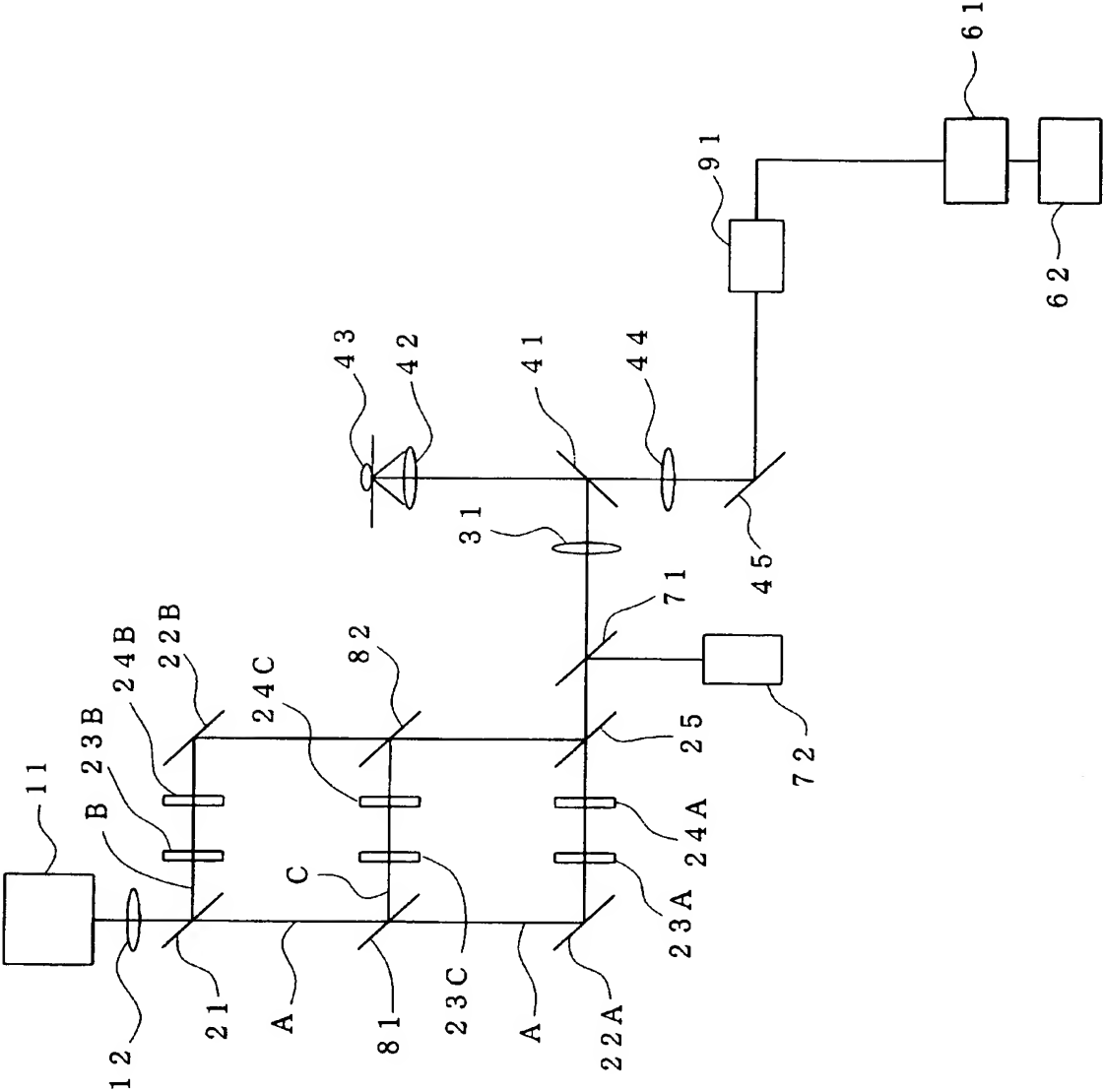
【図 7】



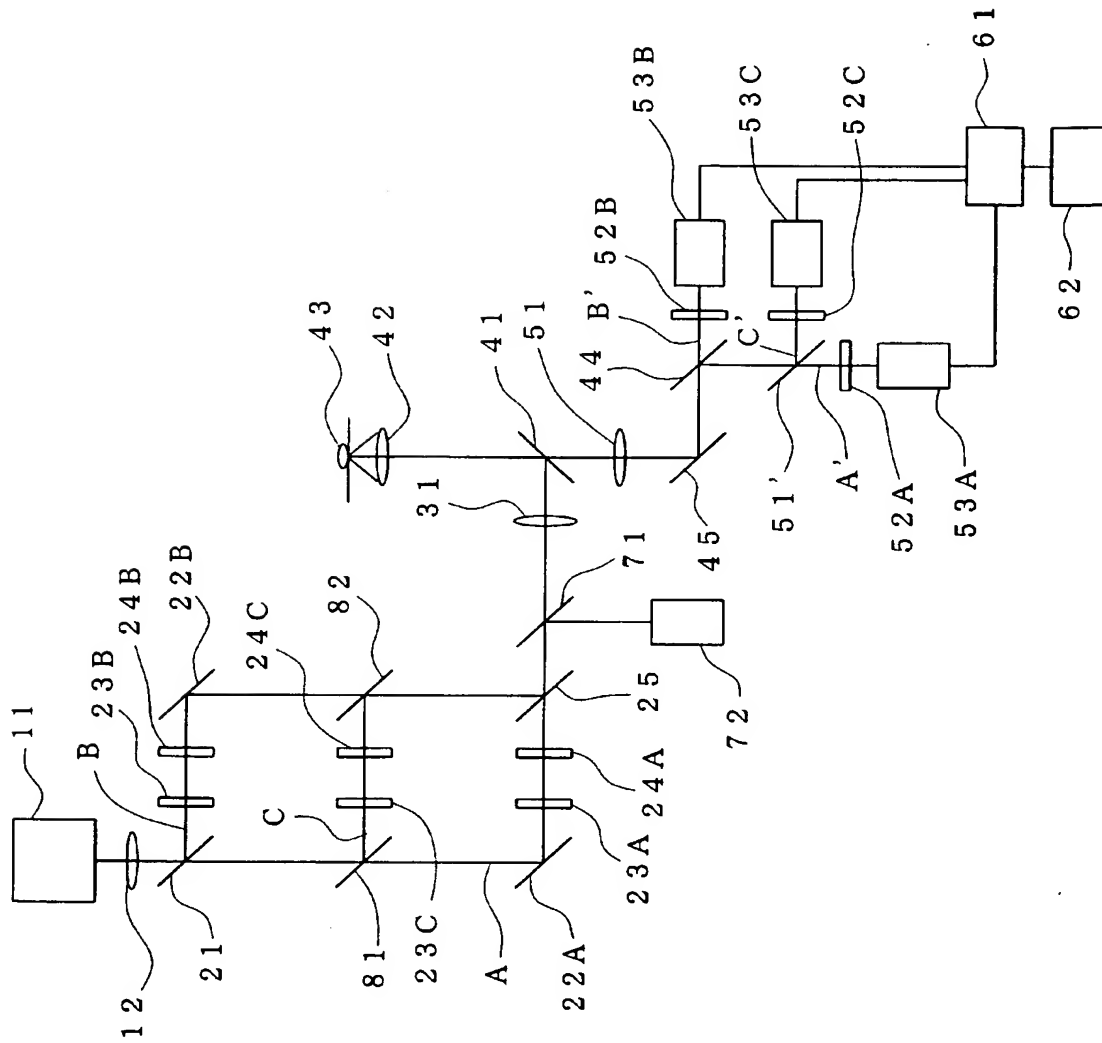
【図 8】



【図 9】

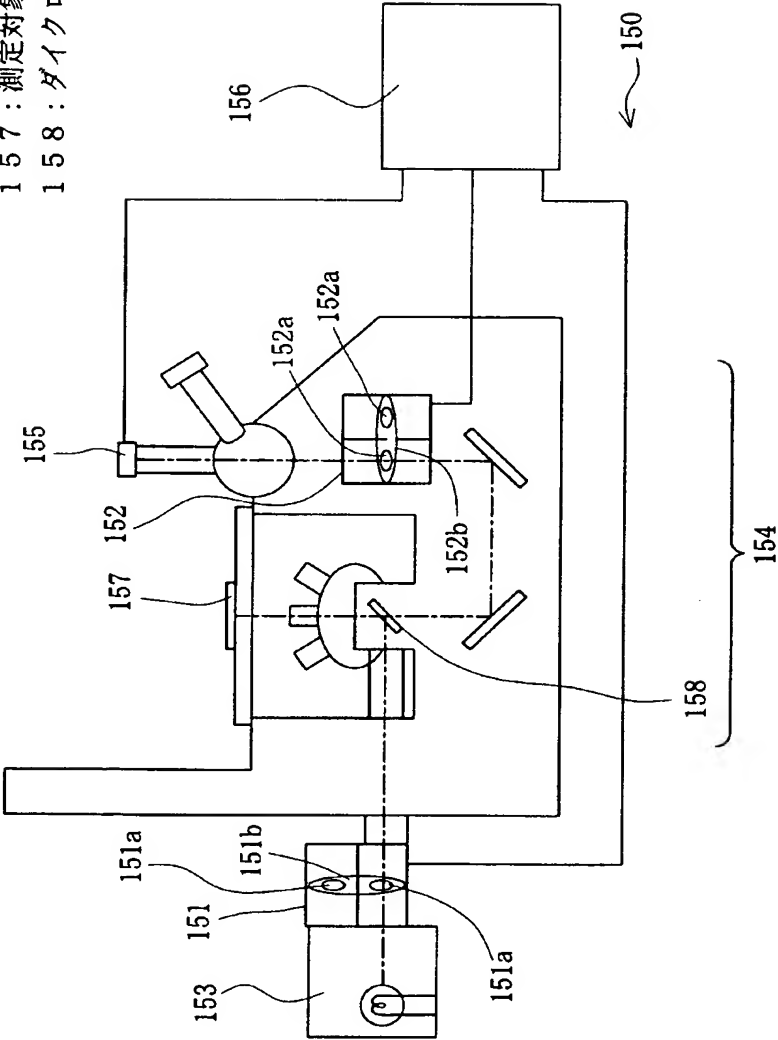


【図 10】

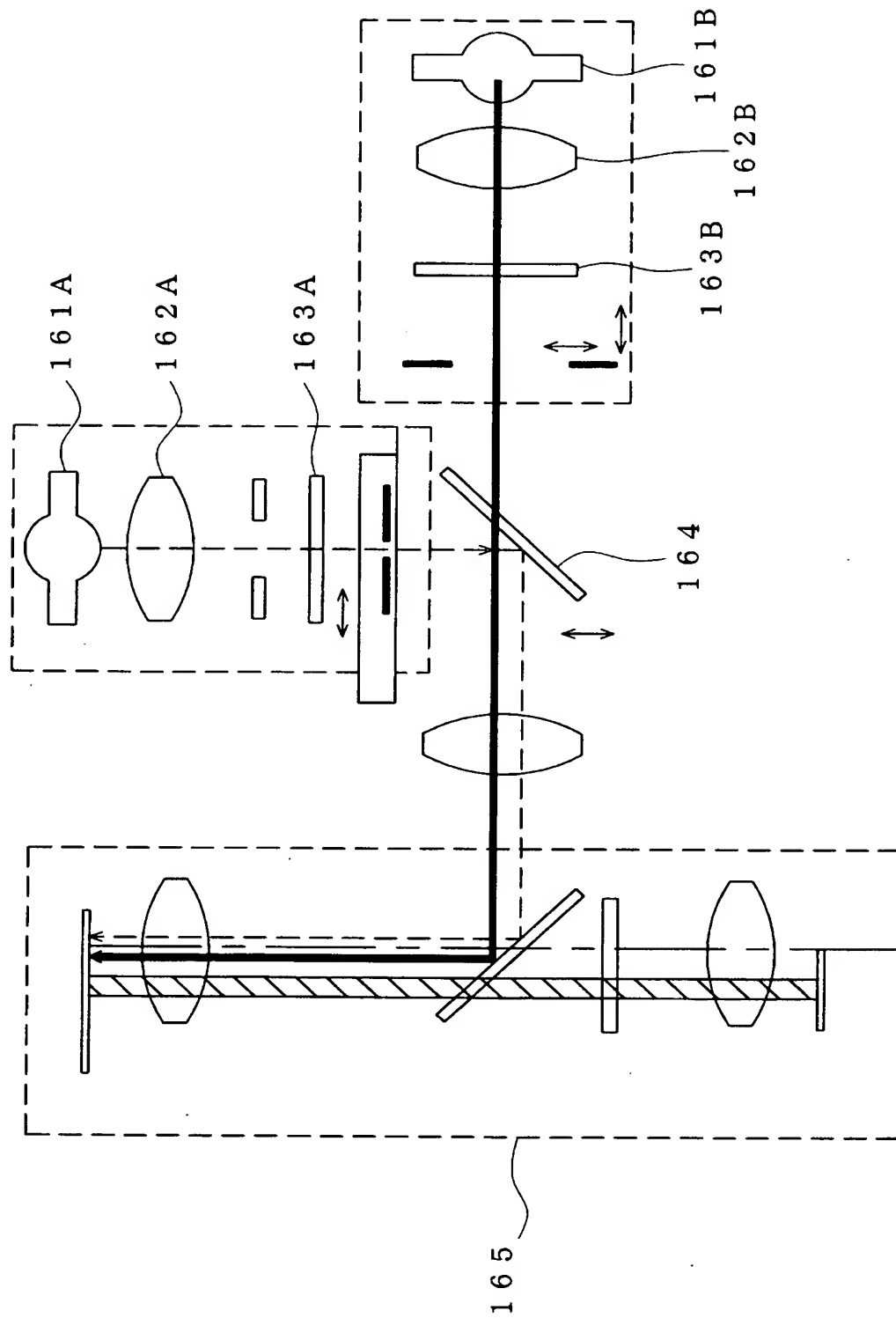


【図 11】

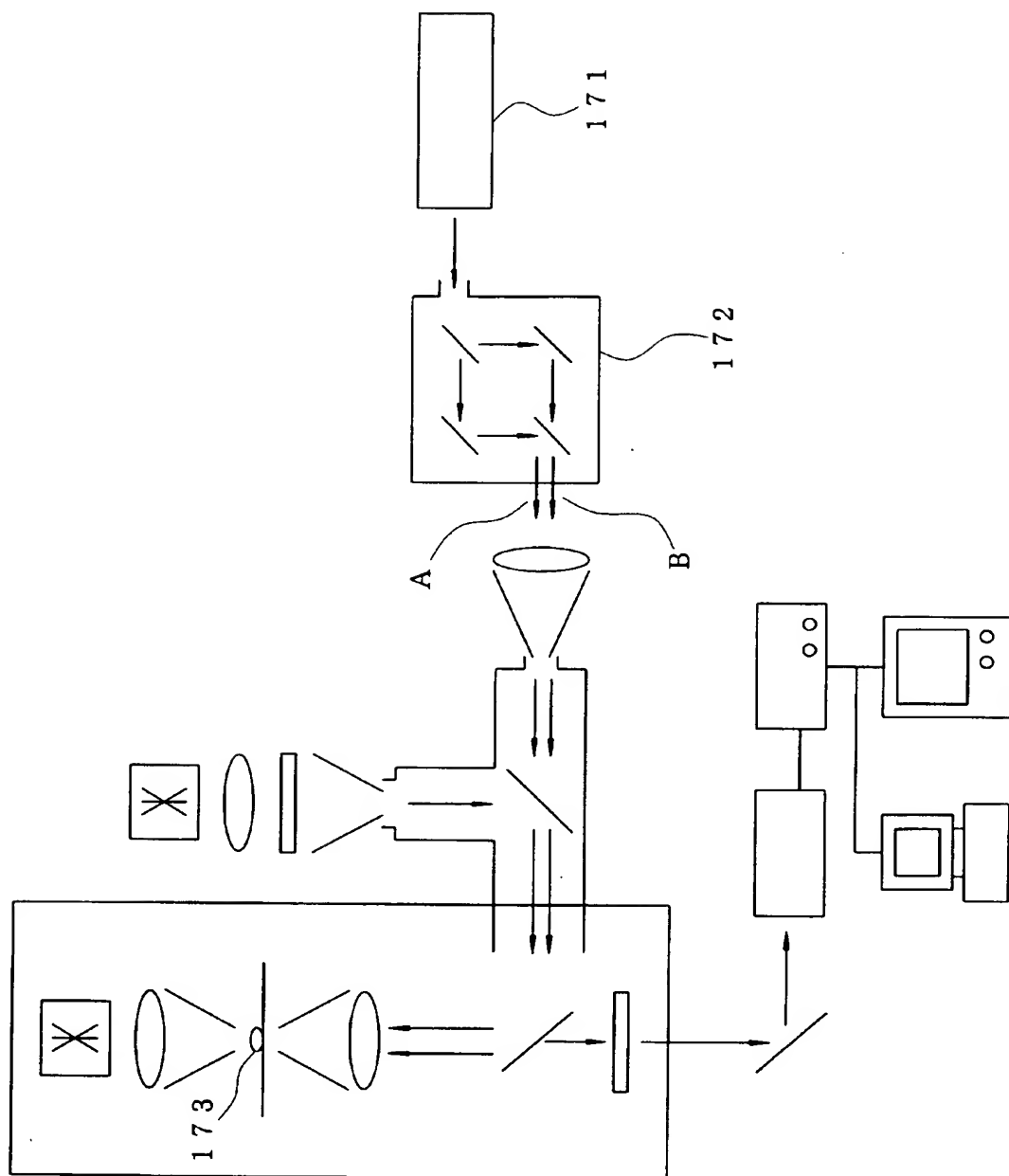
- 150：測定装置
- 154：倒立型蛍光顕微鏡
- 151：励起光選択用フィルタ切換手段
- 152：蛍光選択用フィルタ切換手段
- 153：光源
- 155：フォトダイオード
- 156：制御手段
- 157：測定対象の生体組織
- 158：ダイクロイックミラー



【図 12】



【図 13】



【書類名】 要約書

【課題】 標本に複数の波長の光を同時にかつ同一の照射強度分布で照射することができ、夫々の光の波長や強度を独立して設定することができる顕微鏡の照明装置及びその照明装置を用いた画像処理装置を提供する。

【解決手段】 光源 1 1 と、光源 1 1 からの光束を第 1 及び第 2 の照射光の光束 A, B に分岐する半透鏡 2 1 と、第 1 及び第 2 の照射光の波長を選択する励起フィルタ 2 4 A, 2 4 B と、波長が選択された第 1 及び第 2 の照射光の光束 A, B を単一の光束に合成する半透鏡 2 5 と、半透鏡 2 5 で合成された光束を試料 4 3 に導くとともに、試料 4 3 からの光を透過するダイクロイックミラー 4 1 と、対物レンズ 4 2 と、試料 4 3 からの蛍光を第 1 及び第 2 の波長で励起された蛍光に分離して撮像するカメラ 5 3 A, 5 3 B と、撮像素子 5 3 A, 5 3 B で撮像された蛍光像を処理する画像処理部 6 1 とを備えている。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 2 - 3 4 3 8 0 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 6 7 9 2]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

氏 名

理化学研究所

特願 2 0 0 2 - 3 4 3 8 0 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 3 7 6]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号

氏 名

オリンパス光学工業株式会社